



Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia  
Universidade Técnica de Lisboa**



## **VALORIZAÇÃO DO TOMATE NACIONAL** **Extracção de licopeno por CO<sub>2</sub> supercrítico** **a partir de repiso de tomate**

**Miguel Gaspar Gama da Roca**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientador: Professora Doutora Margarida Moldão Martins

### **Júri:**

Presidente: Doutora Maria Luísa Duarte Martins Beirão da Costa, Professora Catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Gabriela Bernardo Gil, Professora Associada do Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor António Eduardo Leitão, Investigador Auxiliar do Instituto de Investigação Científica Tropical

Lisboa, 2009

# Agradecimentos

À Prof.<sup>a</sup> Doutora Eng.<sup>a</sup> Margarida Moldão Martins, minha orientadora científica, pelo desafio proposto e pelo inestimável apoio recebido durante a execução deste trabalho.

À Doutora Eng.<sup>a</sup> Sara Beirão da Costa, pela sua inteira disponibilidade e empenho pessoal na realização deste projecto, não só durante os ensaios experimentais mas também na análise dos resultados.

À Doutora Eng.<sup>a</sup> Maria Luísa Beirão da Costa, cujo auxílio e esclarecimentos foram indispensáveis.

À Doutora Eng.<sup>a</sup> Gabriela Bernardo Gil e à Doutora Eng.<sup>a</sup> Maria Albertina Ribeiro, pelas instalações supercríticas que disponibilizaram, indispensáveis à realização deste trabalho, e por todo o apoio prestado durante os ensaios de extracção.

Ao Eng.<sup>o</sup> Ricardo Roque, pelo apoio e esclarecimentos prestados durante os ensaios supercríticos no Instituto Superior Técnico.

Ao Doutor Eng.<sup>o</sup> António Eduardo Leitão, pela disponibilidade concedida na realização das análises por HPLC dos extractos supercríticos.

À Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Luísa Louro Martins pela sua importante contribuição durante as análises químicas realizadas.

A todo o pessoal de laboratório que me auxiliou durante a realização da componente prática deste trabalho, nomeadamente à D<sup>a</sup> Maria Júlia, D<sup>a</sup> Graziela e Marília.

À Rosário, pelo permanente e incansável apoio, principalmente nos maus momentos, que me ajudaram a levar este trabalho até ao fim.

A todos os colegas que me acompanharam ao longo destes anos, nomeadamente à Patrícia Ribeiro e à Sofia Costa, pela sua amizade e pelos momentos memoráveis que passámos juntos durante a realização de inúmeros trabalhos.

A todos os meus amigos, pela sua amizade e companheirismo demonstrados ao longo de todos estes anos.

À Tânia, por todo o apoio e carinho que me deu durante a realização deste trabalho e sempre que necessitei. A sua presença na minha vida é muito importante.

A todos aqueles que não tendo sido referidos, mas de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, nomeadamente ao Fusco, pelas longas horas de companhia que me concedeu, o meu muito obrigado.

Aos meus pais e a eles em especial, o meu agradecimento. O seu amor incondicional e apoio durante todas as fases da minha vida, boas e más, foram indispensáveis e muito importantes. A eles dedico este trabalho.

# Resumo

O objectivo do presente estudo é dar um contributo para a valorização do tomate nacional. Numa primeira fase realizou-se uma caracterização físico-química e sensorial de tomate para indústria de origem portuguesa e espanhola. O objectivo desta fase foi verificar a qualidade superior do tomate nacional, nomeadamente no que diz respeito ao teor de licopeno. Na segunda fase, porque os teores de licopeno o justificaram e atendendo às quantidades de subproduto produzidas pela indústria de concentrado de tomate, procedeu-se à extracção de licopeno por CO<sub>2</sub> supercrítico a partir de repiso de tomate, para posterior uso na indústria alimentar. Mantendo uma pressão constante de 20MPa, as variáveis independentes estudadas foram a temperatura, a concentração de etanol e a concentração de azeite como co-solventes. Estabeleceu-se uma matriz de delineamento experimental com os seguintes limites de variação: Temperatura 40-75°C, [Etanol] 0-10% (m/m) e [Azeite] 0-10% (m/m). A temperatura revelou promover um efeito negativo no rendimento de extracção, enquanto que o etanol e o azeite não revelaram ter efeito significativo na extracção supercrítica de carotenóides. O rendimento de extracção de licopeno por CO<sub>2</sub> supercrítico obtido foi de 5,7%, e verificou-se a existência de uma temperatura óptima de extracção para este carotenóide nos 50°C.

## **Palavras-chave:**

Tomate, Repiso, Licopeno, Carotenóides, Extracção, CO<sub>2</sub> Supercrítico.

# Abstract

The main objective of the present work is to contribute for the valorisation of the Portuguese tomato. In the first phase, a physicochemical and sensory characterization of Portuguese and Spanish tomato for industry was conducted. The objective of this study was to verify the quality of Portuguese tomato, with special relevance to its lycopene content. On a second phase, because lycopene content justified it and considering the large amounts of by-products produced by tomato industries, a supercritical CO<sub>2</sub> extraction of lycopene from tomato pomace was performed. The studied independent variables were temperature, concentration of ethanol and concentration of olive oil, both added has a co-solvent. The matrix was established for the following ranges: Temperature 40-75°C, [Ethanol] 0-10% (m/m) and [Olive Oil] 0-10% (m/m). Temperature revealed to have a negative effect on the extraction yield, while ethanol and olive oil showed no significant effect in supercritical CO<sub>2</sub> extraction of carotenoids. The extraction yield of lycopene was 5,7% and an optimal temperature of 50°C was showed.

## **Keywords:**

Tomato, Pomace, Lycopene, Carotenoids, Extraction, Supercritical CO<sub>2</sub>

## Extended Abstract

Worldwide, tomatoes constitute an important agriculture crop and an integral part of the human diet. Although tomatoes are consumed fresh, over 80% of the tomato consumption comes from processed products such as tomato juice, paste, puree, ketchup and sauce. Portugal has excellent conditions for tomato growth and it's the third greatest producer of tomato based processed products, behind the United States of America and Italy. Lycopene is the major carotenoid found in tomatoes, along with lesser amounts of  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene. Lycopene is found predominantly in the chromoplasts of plant tissues. The largest concentrations of lycopene are found in the pericarp. The amounts of lycopene and  $\beta$ -carotene are three times higher in skin and at least five times higher in tomato waste than in other tomato products. Structurally, lycopene is a highly unsaturated aliphatic hydrocarbon. Its chain contains 13 carbon-carbon double bonds, 11 of which are conjugated and arranged in a linear array. Lycopene is known to exist in a variety of geometric isomers, including all-*trans*, mono-*cis* and poli-*cis* forms. The all-*trans* configuration predominates in fresh tomatoes and gradually isomerizes to *Cis* configurations upon processing and storage of tomato products.

With its acyclic structure, large array of conjugated double bonds and important hydrophobicity, lycopene exhibits a range of unique and distinct biological properties, particularly in relation to its effect as a natural antioxidant. Although it has no provitamin A activity, lycopene does exhibit a physical quenching rate constant for singlet oxygen almost twice as high as that of  $\beta$ -carotene. This makes its presence in the diet of considerable interest. Increasing clinical evidence supports the role of lycopene as a micronutrient with important health benefits, because it appears to provide protection against a broad range of epithelial cancers, such as breast cancer, lung cancer, stomach cancer and prostate cancer. Lycopene is believed to prevent oxidation of LDL cholesterol and reduce the risk of developing atherosclerosis and coronary heart disease. Evidence is now being obtained that suggests that lycopene may have direct stimulatory effects on the response of the immune system. This may involve an antioxidant action, and it could form the basis of a proactive action against not only cancer, but also against human immunodeficiency virus (HIV) and acquire immune deficiency syndrome (AIDS) (Shi *et al.*, 2002). Food industries generate large amounts of wastes and by-products that contain highly valuable biologically active compounds. The importance of natural food additives is increasing due to a more extensive use of natural compounds in food, cosmetics and pharmaceuticals. The recycling or re-usage

of these by-products or wastes that are accumulated during processing and available in high amounts can reduce the treatment costs. At present, large quantities of tomato skin and outer pericarp tissue are discarded as a waste product from the peeling operation. The amount of tomato processing wastes in Portugal is approximately 55000t/year. As it is available in high amount it can be an economic and reasonable choice to produce health promoting products rich in lycopene and other carotenoids. Since lycopene is highly lipophilic, it can be extracted with organic solvents, which are usually toxic, expensive and hazardous to handle and may remain in the product. Customer concern about health and environment has resulted in increasing interest in clean technologies and alternative reliable extraction methods for lycopene and other carotenoids. Supercritical fluid extraction has provided an excellent alternative to the use of organic solvents. This type of extraction is an advanced separation technique based on the enhanced solvating power of fluids above their critical point. One of the most frequently used supercritical fluids is carbon dioxide. Besides the advantages of having a low critical temperature and being neither toxic nor flammable, carbon dioxide is also available at low cost and high purity. Thanks to its low critical temperature, it can also be used to extract thermally labile compounds such as carotenoids. On account of this characteristics, the fluid is an ideal solvent in the food, pharmaceutical and cosmetic industries, where it is essential to obtain final products of a high degree of purity. During the extraction processes, CO<sub>2</sub> behaves similarly to a liquid, penetrating the tomato skin to dissolve lycopene. The solvent strength of a supercritical fluid, which is directly related to its density, can be turned by changing the extraction pressure and temperature.

The main objective of the present work is to contribute for the valorisation of the Portuguese tomato. In the first phase, a physicochemical and sensory characterization of Portuguese and Spanish tomato for industry was conducted. The objective of this study was to verify the quality of Portuguese tomato, with special relevance to its lycopene content. On a second phase, because lycopene content justified it and considering the large amounts of by-products produced by tomato industries, a supercritical CO<sub>2</sub> extraction of lycopene from tomato pomace was performed. The studied independent variables were temperature, concentration of ethanol and concentration of olive oil, both added as a co-solvent. The matrix was established for the following ranges: Temperature 40-75°C, [Ethanol] 0-10% (m/m) and [Olive Oil] 0-10% (m/m). Temperature revealed to have a negative effect on the extraction yield, while ethanol and olive oil showed no significant effect in supercritical CO<sub>2</sub> extraction of carotenoids. The extraction yield of lycopene was 5,7% and an optimal temperature of 50°C was showed.

# Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
Extended Abstract .....	v
Índice .....	vii
Lista de Figuras .....	ix
Lista de Quadros .....	xi
1. Introdução .....	1
2. Tomate .....	3
2.1. Origem .....	3
2.2. Morfologia .....	3
2.3. Composição .....	4
2.4. Qualidade .....	5
3. Licopeno .....	6
3.1. Estrutura .....	6
3.2. Ocorrência na Natureza .....	7
3.3. Biodisponibilidade .....	8
3.4. Efeitos na Saúde Humana .....	9
4. Concentrado de Tomate .....	11
4.1. Processo Industrial .....	11
4.2. Repiso de Tomate .....	13
5. Metodologias de Extração de Licopeno .....	14
5.1. Metodologias Convencionais .....	14
5.2. Extração por Fluidos Supercríticos .....	15
5.2.1. Fundamentos da Extração com Fluidos Supercríticos .....	16
5.2.2. Características dos Fluidos Supercríticos .....	17
5.2.3. Dióxido de Carbono como Fluido Supercrítico .....	17
5.2.4. Extração de Carotenóides por CO <sub>2</sub> Supercrítico .....	18
6. Desenvolvimento Experimental .....	22
6.1. Caracterização Físico-Química e Sensorial do Tomate .....	22
6.1.1. Material e Métodos .....	22
6.1.2. Resultados e Discussão .....	26
6.2. Extração de Licopeno por CO <sub>2</sub> Supercrítico .....	35



6.2.1. Condições de Extracção.....	35
6.2.2. Preparação da Amostra.....	36
6.2.3. Descrição das Instalações.....	38
6.2.4. Preparação da Instalação.....	42
6.2.5. Preparação do Ensaio .....	42
6.2.6. Procedimento de Extracção .....	43
6.2.7. Procedimento de Recolha .....	44
6.2.8. Preparação dos Extractos .....	45
6.2.9. Análise dos Extractos por HPLC .....	46
6.2.10. Resultados e Discussão .....	47
7. Conclusões.....	59
8. Referências Bibliográficas.....	60
9. Anexos .....	64
Anexo I – Curva Padrão do Ácido Gálico .....	64
Anexo II – Ficha de Análise Sensorial de Tomate Fresco .....	65
Anexo III – Resultados da Análise Físico-Química de Tomate Fresco .....	66
Anexo IV – Resultados da Análise Sensorial de Tomate Fresco .....	67
Anexo V – Resultados da Extracção Supercrítica.....	68

# Lista de Figuras

Fig. 2.1: Secção transversal de um fruto com cinco lóculos .....	3
Fig. 2.2: Composição química do tomate .....	4
Fig. 3.1: Estrutura molecular do licopeno .....	6
Fig. 4.1: Diagrama de processo do concentrado de tomate .....	12
Fig. 5.1: Diagrama de fases de uma substância pura .....	16
Fig. 6.1: Parâmetros LCh da cor de tomate fresco .....	26
Fig. 6.2: Textura de tomate fresco .....	27
Fig. 6.3: Teor de humidade de tomate fresco .....	28
Fig. 6.4: Teor de sólidos solúveis de tomate fresco .....	28
Fig. 6.5: Acidez titulável de tomate fresco .....	29
Fig. 6.6: Teor de ácido ascórbico de tomate fresco .....	30
Fig. 6.7: Análise de pH de tomate fresco .....	30
Fig. 6.8: Teor de fibra de tomate fresco .....	31
Fig. 6.9: Fenóis totais de tomate fresco .....	31
Fig. 6.10: Teor de licopeno em base húmida e base seca de tomate fresco .....	32
Fig. 6.11: Perfil sensorial do tomate de origem portuguesa .....	34
Fig. 6.12: Perfil sensorial do tomate de origem espanhola .....	34
Fig. 6.13: Câmara de congelação do liofilizador .....	36
Fig. 6.14: Jogo de crivos e repiso embalado .....	37
Fig. 6.15: Diagrama da instalação supercrítica .....	38
Fig. 6.16: Bomba de pistão "Air Driven" .....	39
Fig. 6.17: Corpo do extractor sem tampa .....	40
Fig. 6.18: Extractor com tampa apertada .....	40
Fig. 6.19: Zona de recolha de solutos .....	41
Fig. 6.20: Válvula de ar comprimido .....	43
Fig. 6.21: Evaporador rotativo .....	45
Fig. 6.22: Extractos para HPLC .....	46
Fig. 6.23: Superfície de resposta para o extracto total em função das variáveis independentes concentração de etanol e temperatura .....	47
Fig. 6.24: Superfície de resposta para o extracto total em função das variáveis independentes concentração de azeite e temperatura .....	48
Fig. 6.25: Superfície de resposta para o extracto total em função das variáveis independentes concentração de azeite e concentração de etanol .....	48

Fig. 6.26: Superfície de resposta para o licopeno total em função das variáveis independentes concentração de etanol e temperatura .....	49
Fig. 6.27: Superfície de resposta para o licopeno total em função das variáveis independentes concentração de azeite e temperatura .....	50
Fig. 6.28: Superfície de resposta para o licopeno total em função das variáveis independentes concentração de azeite e concentração de etanol .....	50
Fig. 6.29: Superfície de resposta para o $\alpha$ -caroteno total em função das variáveis independentes concentração de etanol e temperatura .....	51
Fig. 6.30: Superfície de resposta para o $\alpha$ -caroteno total em função das variáveis independentes concentração de azeite e temperatura .....	51
Fig. 6.31: Superfície de resposta para o $\alpha$ -caroteno total em função das variáveis independentes concentração de azeite e concentração de etanol .....	52
Fig. 6.32: Superfície de resposta para o $\beta$ -caroteno total em função das variáveis independentes concentração de etanol e temperatura .....	53
Fig. 6.33: Superfície de resposta para o $\beta$ -caroteno total em função das variáveis independentes concentração de azeite e temperatura .....	53
Fig. 6.34: Superfície de resposta para o $\beta$ -caroteno total em função das variáveis independentes concentração de azeite e concentração de etanol .....	54
Fig. 6.35: Superfície de resposta para os outros carotenóides em função das variáveis independentes concentração de etanol e temperatura .....	55
Fig. 6.36: Superfície de resposta para os outros carotenóides em função das variáveis independentes concentração de azeite e temperatura .....	55
Fig. 6.37: Superfície de resposta para os outros carotenóides em função das variáveis independentes concentração de azeite e concentração de etanol .....	56
Fig. 6.38: Superfície de resposta para os carotenóides totais em função das variáveis independentes concentração de etanol e temperatura .....	56
Fig. 6.39: Superfície de resposta para os carotenóides totais em função das variáveis independentes concentração de azeite e temperatura .....	57
Fig. 6.40: Superfície de resposta para os carotenóides totais em função das variáveis independentes concentração de azeite e concentração de etanol .....	57

## Lista de Quadros

Quadro 3.1: Propriedades físicas do licopeno .....	6
Quadro 3.2: Teores de licopeno de alguns frutos e vegetais.....	7
Quadro 6.1: Limites de variação das variáveis independentes.....	35
Quadro 6.2: Matriz do delineamento experimental .....	35
Quadro 6.3: Parâmetros de extracção constantes.....	36
Quadro 6.4: Condições de recolha dos extractos .....	44
Quadro 6.5: Síntese dos efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes.....	58

# 1. Introdução

O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) é um dos hortícolas mais difundidos no mundo e ocupa um lugar de destaque na mesa do consumidor. Apresenta um dos maiores volumes de produção mundial, apenas ultrapassado pela batata e batata-doce. Os principais países produtores de tomate são os Estados Unidos da América, a Rússia, a Turquia, a China, o Egipto e a Itália. Estima-se que 80% da produção mundial de tomate se destine ao processamento industrial, que se centra principalmente em duas regiões: Califórnia e Itália (Hobson e Grierson, 1993). O tomate é consumido em fresco como ingrediente de saladas, em forma de concentrado, sumo de tomate, desidratado como ingrediente em sopas, molhos como *ketchup*, etc. (Borguini, 2002).

Portugal possui características edafo-climáticas excelentes para o cultivo do tomate, o que faz do nosso país o terceiro maior produtor de tomate processado, a seguir aos Estados Unidos da América e à Itália. Em Portugal a cultura do tomate ocupa 14500 hectares de terrenos de regadio, com 712 produtores agrupados em 32 organizações, empregando cerca de 5000 trabalhadores directa e indirectamente. Grande parte do tomate produzido é industrializado e transformado em concentrado. Em Portugal, a indústria de concentrado de tomate descarta todos os anos cerca de 55000 toneladas de subproduto, repiso, constituído essencialmente por películas e sementes, sendo extremamente rico em compostos biologicamente activos. Presentemente o repiso de tomate destina-se essencialmente à alimentação de ruminantes. Dada a produção concentrada no tempo (Julho, Agosto e Setembro) e os elevados custos que a respectiva conservação acarretaria, constitui um problema ambiental para as unidades industriais, o que faz com que estas o vendam por valores muito baixos. A extracção de licopeno, principal carotenóide do tomate, a partir do repiso de tomate, para posterior incorporação em alimentos ou outros produtos, surge como uma forma possível de valorizar este subproduto.

O licopeno representa aproximadamente 80-90 % do total de carotenóides presentes no tomate e encontra-se distribuído por todo o fruto, localizando-se em maiores concentrações na zona adjacente ao pericarpo. O papel do licopeno na prevenção de diversas doenças tem sido alvo de inúmeros estudos, que comprovam o seu efeito benéfico para a saúde humana. A ingestão de licopeno está relacionada com a redução da incidência de alguns cancros e com a prevenção de acidentes cardiovasculares. O seu poder antioxidante e capacidade de interacção com radicais livres são também muito importantes.

Existem ainda alguns indícios da possibilidade de o licopeno ser capaz de estimular o sistema imunitário do ser humano actuando como base para a protecção contra a síndrome de imunodeficiência adquirida.

A extracção de compostos naturais a partir de material vegetal é muitas vezes efectuada através de solventes orgânicos. O grande problema deste tipo de extracção é a toxicidade de alguns dos solventes utilizados, que inviabiliza a sua utilização no domínio alimentar. O consumidor actual está cada vez mais alertado para os perigos de contaminação dos alimentos e as leis que restringem a utilização de solventes orgânicos na indústria alimentar são cada vez mais apertadas. A extracção supercrítica surge assim como uma alternativa à extracção por solventes orgânicos. A utilização de CO<sub>2</sub> supercrítico para extrair compostos biologicamente activos como o licopeno, permite a obtenção de extractos inócuos e apresenta ainda vantagens adicionais.

O objectivo do presente trabalho consistiu no estudo da valorização do tomate de origem nacional. Para tal efectuou-se uma caracterização física, química e sensorial de tomate para indústria de origem nacional e de origem espanhola. Numa segunda fase, atendendo aos elevados teores em licopeno do tomate nacional e aos elevados volumes de subproduto da indústria de concentrado de tomate, procedeu-se ao estudo da extracção de licopeno por CO<sub>2</sub> supercrítico a partir de repiso de tomate.

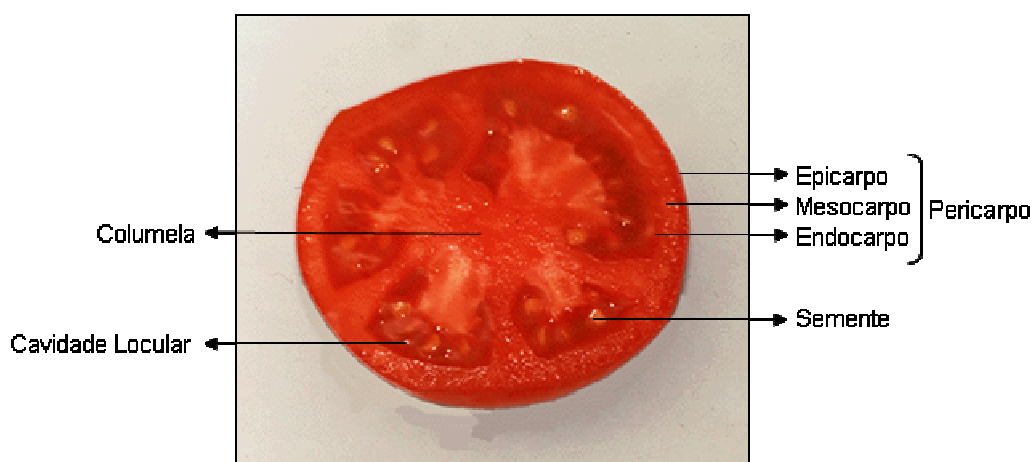
## 2. Tomate

### 2.1. Origem

O tomate é o fruto do tomateiro, planta da família das *Solanáceas*, originária da parte ocidental da América Central e do Sul, mais propriamente do Peru, Bolívia e Equador (Fontes e Silva, 2002). Embora tenha origem nos países referidos, foi no México que se iniciou a domesticação do tomate cultivado. O seu nome deriva da palavra Azteca “xitomate”. No século XVI o tomate foi trazido para a Europa e em poucos anos a sua cultura espalhou-se pelos diferentes países deste continente, embora fosse considerado mais uma planta medicinal ou ornamental do que uma planta para fim alimentar (Pazinato e Galhardo, 1997). Os povos do Mediterrâneo, principalmente do sul da Itália e da Turquia, bem como os espanhóis, foram os primeiros a introduzir o tomate na sua alimentação (Gardê e Gardê, 1997).

### 2.2. Morfologia

O tomate de mesa, fruto da espécie *Lycopersicon esculentum* Mill., é uma baga carnuda, succulenta e de cor vermelha quando madura, com dois ou mais lóculos, podendo mesmo atingir 12 lóculos (Fontes e Silva, 2002). Na **Fig. 2.1** apresenta-se um fruto com 5 lóculos, em que se evidencia o pericarpo, constituído por três camadas: epicarpo, mesocarpo e endocarpo. É nesta zona que se encontra a maior concentração de licopeno.

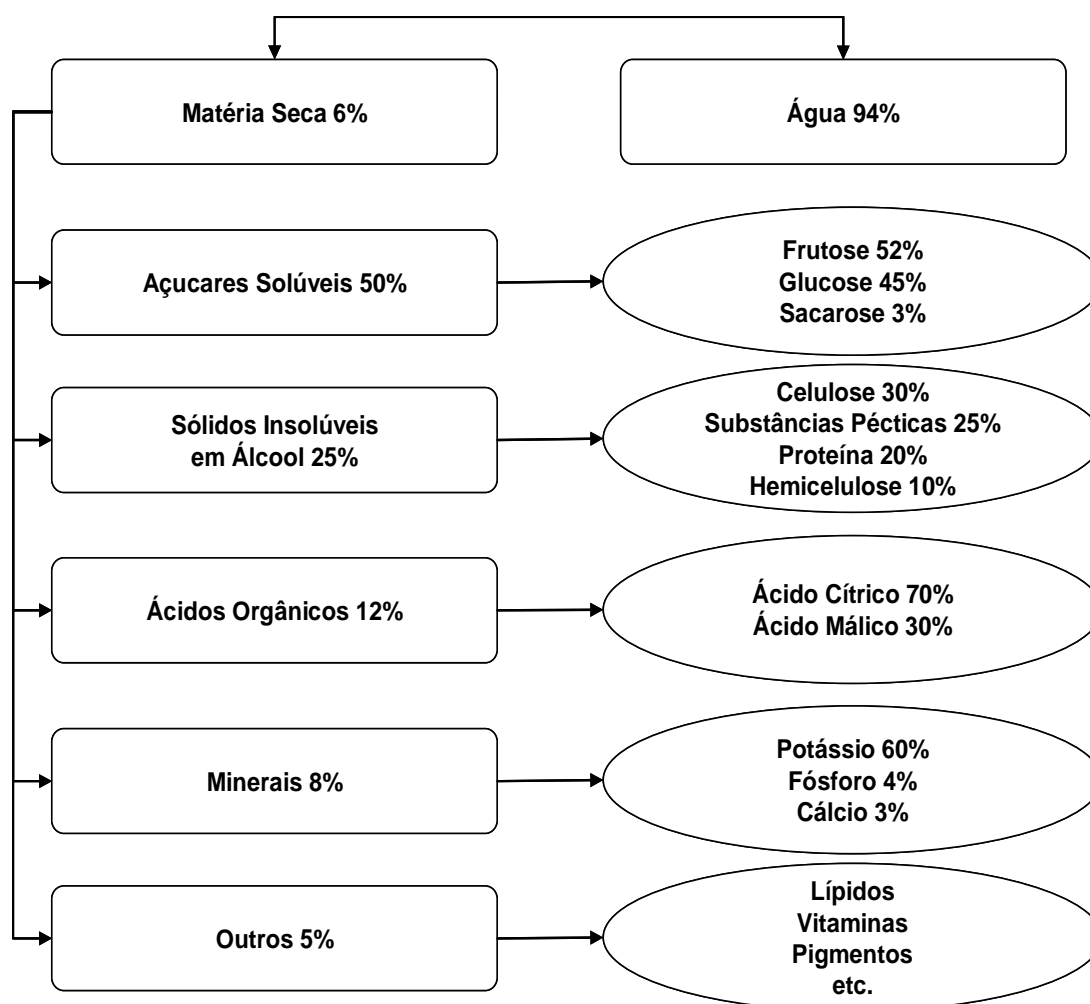


**Fig. 2.1: Secção transversal de um fruto com cinco lóculos**

Como se pode observar as sementes estão imersas no tecido placentário, que preenche as cavidades loculares do fruto. No tomate para indústria é importante que as cavidades loculares sejam o mais reduzidas possível.

## 2.3. Composição

O tomate, tal como a maioria dos frutos, é constituído essencialmente por água, que representa cerca de 94% dos constituintes totais. Os restantes 6%, correspondentes a matéria seca, compreendem açúcares solúveis, sólidos insolúveis em álcool, ácidos orgânicos, minerais (sendo o potássio, o fósforo e o cálcio os mais representativos) e outros constituintes como lípidos, vitaminas e pigmentos, como se pode ver na **Fig. 2.2**.



**Fig. 2.2: Composição química do tomate**



## 2.4. Qualidade

A qualidade dos frutos pode ser definida como um conjunto de inúmeras características que diferenciam componentes individuais de um mesmo produto e que têm influência na determinação do grau de aceitação por parte do consumidor (Chitarra, 1994).

Em tomate fresco a qualidade é determinada pela cor, aspecto visual, firmeza, *flavour* e valor nutritivo (Artés *et al.*, 1998). A perda de qualidade do produto ocorre ao longo da cadeia de produção até chegar ao consumidor e pode dever-se a processos fisiológicos normais, em conjugação com eventuais danos mecânicos, factores biológicos, como doenças e pragas, contaminações microbianas e desordens fisiológicas (Fonseca e Moraes, 2000).

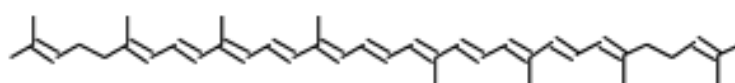
O estado de maturação à colheita é muito importante, pois determina a evolução do processo de maturação pós-colheita, que por sua vez também vai influenciar a qualidade do produto que chega ao consumidor (Moura *et al.*, 1999). A maior parte do tomate comercializado é colhida no estado de maturidade fisiológica e completa o processo de maturação durante o transporte até ao destino, em condições adequadas (Ferreira, 2004). Durante o período de pós-colheita as reacções de transformação e degradação do tomate são fortemente influenciadas pela temperatura. Por se tratar de um fruto climatérico, a taxa respiratória sofre um aumento rápido no início do amadurecimento até atingir o pico climatérico, resultando uma série de transformações físico-químicas caracterizadas por alterações fisiológicas e bioquímicas no fruto, nomeadamente: degradação do amido; produção de glucose e frutose; síntese de pigmentos como o  $\alpha$ -caroteno, o  $\beta$ -caroteno e o licopeno; aumento da síntese de etileno; aumento de pectinas solúveis e consequentemente amolecimento das paredes celulares (Fachin, 2003).

Existem vários indicadores utilizados para avaliar a qualidade do tomate no período pós-colheita, entre os quais se destacam a cor, textura, acidez titulável total, teor de ácido ascórbico, teor de sólidos solúveis, pH, teor de fibra, fenóis totais e teor de licopeno. A alteração da coloração do fruto envolve a degradação de clorofila e a síntese de pigmentos como  $\beta$ -caroteno, licopeno e xantofilas, à medida que os cloroplastos são transformados em cromoplastos (Wien, 1997). A avaliação sensorial da cor permite identificar a qualidade do produto como também medir o amadurecimento do fruto (Borguini, 2002). Actualmente, o consumidor dá cada vez mais importância às características nutritivas dos alimentos e aos seus benefícios para a saúde. Neste sentido o tomate assume-se como um alimento de grande importância para a saúde humana, principalmente devido à presença de licopeno.

## 3. Licopeno

### 3.1. Estrutura

O licopeno é um carotenóide lipofílico de cor vermelha. Em termos estruturais é um hidrocarboneto alifático poli-insaturado ( $C_{40}H_{56}$ ), com 13 ligações covalentes duplas, como representado na **Fig. 3.1**.



**Fig. 3.1: Estrutura molecular do licopeno**

Na molécula de licopeno 11 das 13 ligações duplas são conjugadas e formam uma estrutura linear. Este extenso sistema de duplas ligações é a chave para a actividade biológica do licopeno, o que inclui a sua enorme susceptibilidade à degradação oxidativa. A estrutura química do licopeno é também a responsável pela sua cor, solubilidade em lípidos e enorme poder antioxidante. Ao contrário de outros carotenóides, o licopeno não possui actividade de provitamina A (Shi *et al.*, 2002). No **Quadro 3.1** resumem-se algumas das propriedades físicas do licopeno.

**Quadro 3.1: Propriedades físicas do licopeno (Shi *et al.*, 2002)**

Fórmula molecular	Massa molecular	Ponto de fusão
$C_{40}H_{56}$	536,85 Da	172-175 °C

O licopeno apresenta elevada instabilidade, sendo muito susceptível de oxidar ou isomerizar (Shi *et al.*, 2002). Salvo raras excepções, o licopeno ocorre nas plantas na sua forma *Trans*, por se tratar da configuração termodinamicamente mais estável (Emenhiser *et al.*, 1995). Quando exposto a temperaturas elevadas, luz, catalisadores ou superfícies activas, tende a sofrer reacções de isomerização, passando a predominar as formas *Cis*, menos estáveis. Os isómeros *Cis* do licopeno têm propriedades químicas e físicas diferentes dos isómeros *Trans*, nomeadamente maior solubilidade em óleos e solventes hidrocarbonados. Dado que a maioria dos processos envolvidos na transformação industrial de tomate implicam aplicação de calor, os produtos transformados apresentam um predomínio das formas *Cis*. Durante o armazenamento daqueles produtos, ocorre uma

reversão na isomerização passando os isómeros *Cis*, menos estáveis, à sua forma mais estável, ou seja, *Trans* (Shi *et al.*, 2002). Como referido anteriormente, a estrutura acíclica do licopeno e o número elevado de ligações duplas na sua cadeia central, conferem-lhe um enorme poder antioxidante. O seu sistema de ligações duplas conjugadas permite ao licopeno reagir eficientemente com o oxigénio molecular (O<sub>2</sub>) e também interagir com os radicais livres (ROO) (Burton e Ingold, 1984). Esta actividade dos carotenóides está directamente relacionada com o número de ligações duplas conjugadas da sua estrutura.

### 3.2. Ocorrência na Natureza

O licopeno encontra-se amplamente difundido na natureza. Embora apenas seja sintetizado, por via fotossintética, encontra-se também no reino animal por via indirecta. À medida que os órgãos vegetais vão amadurecendo, os níveis de clorofila tendem a diminuir e por consequência o licopeno e outros pigmentos sobressaem mais, conferindo uma cor viva à maioria dos frutos (ananás, laranja, limão, morango, tomate, etc.). O licopeno e outros carotenóides são também responsáveis por algumas das cores presentes no reino animal, nomeadamente em aves como o flamingo e o canário, ou em animais marinhos como o camarão, a lagosta ou o salmão (Shi *et al.*, 2002). No **Quadro 3.2** apresentam-se os teores de licopeno de alguns frutos e vegetais, em base húmida.

**Quadro 3.2: Teores de licopeno de alguns frutos e vegetais (Shi *et al.*, 2002)**

Produto	Teor de Licopeno mg/100g (BH)
Tomate	0,72 – 20,00
Melancia	2,30 – 7,20
Papaia	0,11 – 5,30
Cenoura	0,65 – 0,78
Abóbora	0,38 – 0,46
Batata-doce	0,02 – 0,11

O licopeno é o carotenóide mais representativo do tomate. Entre os outros carotenóides do tomate encontram-se o  $\alpha$ -caroteno, o  $\beta$ -caroteno e a luteína (Curl, 1961). No tomate o licopeno encontra-se predominantemente no interior dos cromoplastos. Estes são mais abundantes na zona exterior do pericarpo. Aqui o licopeno está integrado num complexo de proteínas ligadas por membranas hidrofílicas, encontrando-se na forma cristalina. A biossíntese de licopeno aumenta durante a fase de amadurecimento do tomate, sendo o último carotenóide a ser sintetizado. Nesta fase muitos dos cloroplastos existentes vão dar origem a cromoplastos (Kirk e Tilney-Basset, 1978). O epicarpo do tomate é a zona do fruto onde a concentração em licopeno e outros carotenóides é maior, o que faz com que

o repiso de tomate, subproduto da indústria de concentrado de tomate, possa constituir uma fonte importante de licopeno. O teor de licopeno, bem como de carotenóides em geral, em tomate fresco pode ser influenciado por diversos factores, desde logo variedade, práticas culturais, estado de maturação e condições ambientais durante o estado de maturação e armazenamento pós-colheita. Para uma dada variedade de tomate, o facto de este ser produzido em estufa de vidro, estufa de plástico ou ao ar livre reflecte-se no respectivo teor de licopeno dos frutos, que tende a aumentar por esta ordem (Shi *et al.*, 2002). Estudos efectuados por Lurie *et al.* (1996) mostram que a biossíntese de licopeno é inibida para valores de temperatura superiores a 32°C. No que diz respeito à temperatura do solo, esta deve situar-se entre os 12 e 32°C para que a biossíntese de licopeno seja óptima. Temperaturas fora desta gama inibem a formação dos precursores do licopeno e por consequência a biossíntese do mesmo.

### 3.3. Biodisponibilidade

Um dos pontos mais importantes que é necessário perceber no que diz respeito ao licopeno, é a disponibilidade deste para o organismo humano, ou seja, a capacidade que o homem tem para absorver o licopeno que ingere e o “uso” que lhe vai dar. Biodisponibilidade pode ser definida como a fracção de um produto ingerido, que foi absorvida e está disponível para utilização por parte do organismo em mecanismos fisiológicos e processos metabólicos (Jackson, 1997).

A absorção de licopeno ingerido na alimentação pode ser influenciada por diversos factores como a confecção dos alimentos e as propriedades destes. Para além destes factores existem outros que também podem influenciar a quantidade de licopeno absorvido pelo corpo humano, como: quantidade de licopeno ingerido numa refeição, natureza da matriz do alimento em que o licopeno está inserido, forma e localização do licopeno na matriz, tipo de ligação molecular, interacção com outros carotenóides e nutrientes, teores de xantofilas e clorofilas, etc. (Shi *et al.*, 2002).

O licopeno pode ocorrer no plasma humano numa razão de 1:1 entre isómeros *Cis* e *Trans*. Entre os diversos isómeros do licopeno, os isómeros 5-*cis*, 9-*cis*, 13-*cis* e 15-*cis* são aqueles que o corpo humano tem mais facilidade em absorver, por oposição aos isómeros *Trans* que ocorrem com mais frequência na natureza (Boileau *et al.* 1999). O facto de os isómeros *Cis* serem mais facilmente absorvidos que os isómeros *Trans* explica-se pelo facto de os isómeros *Cis* possuírem uma solubilidade maior em soluções lipofílicas e tenderem a

agregar-se menos, pelo que é pouco provável encontrarem-se na forma cristalina, o que facilita o seu transporte para as células ou para a matriz do tecido (Shi *et al.*, 2002).

A composição e estrutura dos alimentos são de extrema importância para a biodisponibilidade do licopeno. As características dos alimentos podem influenciar a libertação de licopeno das células do tecido do tomate. O facto de se cozinhar ou triturar o tomate, aumenta a biodisponibilidade do licopeno pois leva à destruição das paredes celulares e dos complexos proteicos onde o licopeno está contido (Hussein e El-Tohamy, 1990).

A principal fonte de licopeno na dieta humana é o tomate e seus derivados, como concentrados, molhos, sumos, etc. O licopeno encontra-se menos biodisponível em tomate fresco, pois predominam os isómeros *Trans*, do que em produtos derivados do tomate que sofreram processamento térmico, onde predominam os isómeros *Cis*. Esta biodisponibilidade aumenta ainda mais quando estes produtos alimentares derivados do tomate são ingeridos juntamente com um óleo vegetal, pois constitui o veículo dos mesmos. Desta forma, a solubilização do licopeno numa matriz lipofílica vai aumentar não só a sua biodisponibilidade, mas também a sua actividade. A extracção de licopeno pode então ser optimizada pelo aumento da temperatura e pela adição de co-solventes lipídicos de origem vegetal (Shi *et al.*, 2002). Estudos revelam que a ingestão de alguns tipos de fibra, como é o caso da pectina, podem reduzir a biodisponibilidade dos carotenóides (Rock e Swendseid, 1992).

Os tratamentos térmicos aplicados ao tomate promovem reacções de isomerização do licopeno, que resultam na passagem das formas *Trans* às formas *Cis* o que leva a um aumento da biodisponibilidade do licopeno. No entanto é preciso ter cuidado com o tempo de exposição a temperaturas elevadas, pois para além da destruição do complexo proteico onde o licopeno está inserido, pode-se destruir o próprio licopeno, pelo que os parâmetros de processamento, nomeadamente tempo e temperatura, devem ser optimizados (Shi *et al.*, 2002).

### **3.4. Efeitos na Saúde Humana**

Recentemente, o papel do licopeno na prevenção de diversas doenças tem sido alvo de inúmeros estudos, que comprovam o seu efeito benéfico para a saúde humana. A ingestão de licopeno está relacionada com a redução da incidência de alguns cancros e com

a prevenção de acidentes cardiovasculares. O seu poder antioxidante e capacidade de interacção com radicais livres são responsáveis pelo efeito benéfico do licopeno (Shi *et al.*, 2002).

Um estudo conduzido em Itália com 2706 casos de cancro na cavidade bucal, faringe, esófago, estômago e cólon, provou que o aumento da ingestão de produtos à base de tomate funcionou como protecção para a ocorrência de todos estes tipos de cancro do sistema digestivo (Franceschi *et al.*, 1994). Esta correlação entre o aumento do consumo de tomate e a diminuição do risco de contrair cancro foi relacionado com o aumento de licopeno ingerido. O mesmo estudo concluiu que o facto de se ingerir produtos à base de tomate pelo menos uma vez por dia, reduzia em 50% o risco de cancro no aparelho digestivo. Existem diversos estudos nesta área, que comprovam o efeito benéfico do licopeno na prevenção de outros tipos de cancro, nomeadamente o da próstata. Um artigo da Harvard University of Public Health comprova que os homens que ingerem pelo menos 10 refeições à base de tomate por mês, reduzem em 34% o risco de vir a desenvolver um cancro na próstata (Giovannucci *et al.*, 1995). Neste estudo foram seguidos os hábitos alimentares de 48000 homens durante 4 anos e chegou-se à conclusão que dos 46 tipos de frutos e vegetais estudados, o tomate era o que estava fortemente associado à redução do risco de cancro na próstata. Um artigo publicado por Ribaya-Mercado *et al.* (1995) provou a eficiência do licopeno na protecção da pele humana perante uma situação de stress oxidativo por irradiação com raios UV. Num estudo de Goodman *et al.* (1998) envolvendo 147 pacientes com cancro cervical e 191 indivíduos saudáveis, ficou provado que os teores de licopeno no sangue eram significativamente mais baixos nos sujeitos com cancro.

Foram também efectuados diversos estudos acerca do papel do licopeno na prevenção da arteriosclerose e diversas doenças coronárias. Riso e Porrini (1997) concluíram que o licopeno actua de forma preventiva sobre os lípidos do plasma sanguíneo, protegendo-os de oxidações, reduzindo o risco de contrair arteriosclerose. Um estudo conduzido por Kohlmeir *et al.* (1997) concluiu que o consumo de licopeno pode reduzir o risco de desenvolver doenças cardiovasculares. Para além do efeito preventivo contra a arteriosclerose e diversos tipos de cancro, acredita-se também que o licopeno previne a oxidação do colesterol LDL. O consumo diário de produtos contendo pelo menos 40mg de licopeno, foi o suficiente para reduzir substancialmente a oxidação do colesterol LDL, num estudo efectuado por Agarwal e Rao (1998). Existem ainda alguns indícios da possibilidade de o licopeno ser capaz de estimular o sistema imunitário do ser humano actuando como base para a protecção contra o vírus HIV e síndrome de imunodeficiência adquirida (Shi *et al.*, 2002).

## 4. Concentrado de Tomate

### 4.1. Processo Industrial

Na unidade industrial de produção de concentrado de tomate o processo inicia-se com a descarga e transporte hidráulico do tomate para as linhas de produção, seguindo-se uma lavagem e escolha. O tomate seleccionado e lavado é então triturado e submetido posteriormente a um tratamento térmico em permutadores de calor tubulares para inactivação enzimática (60 a 80°C durante poucos minutos). Após o tratamento térmico segue para a operação de refinação, onde passa através de um conjunto de crivos que fazem a separação da parte sólida, designada por repiso (películas, sementes e fibras de maior dimensão). Conforme a malha dos crivos, obtém-se um sumo mais ou menos refinado, distinguindo-se a produção de concentrado de tomate (produzido exclusivamente de sumo de tomate, passado por um crivo de malha muito fina) da produção de concentrado de tomate triturado (crivo de malha mais larga que deixa passar algumas películas e sementes). O sumo assim obtido é depois sujeito a uma concentração. Nesta operação é retirada ao sumo parte da sua água de constituição de forma a obter um produto mais concentrado. O sumo é concentrado ao valor pretendido através de um ou mais dos seguintes processos:

- Evaporação tradicional sob vácuo;
- Filme descendente com recurso à termocompressão mecânica do vapor;
- Osmose inversa.

O concentrado de tomate é em seguida submetido a um processo de pasteurização para estabilização microbiológica, seguindo-se o processo de embalagem. Segue-se então a codificação e paletização do produto acabado, que é submetido a um período de quarentena, onde são efectuadas algumas análises de controlo de qualidade. Após este período o produto está pronto para expedição. Na **Fig. 4.1** apresenta-se um esquema tipo de produção de concentrado de tomate.

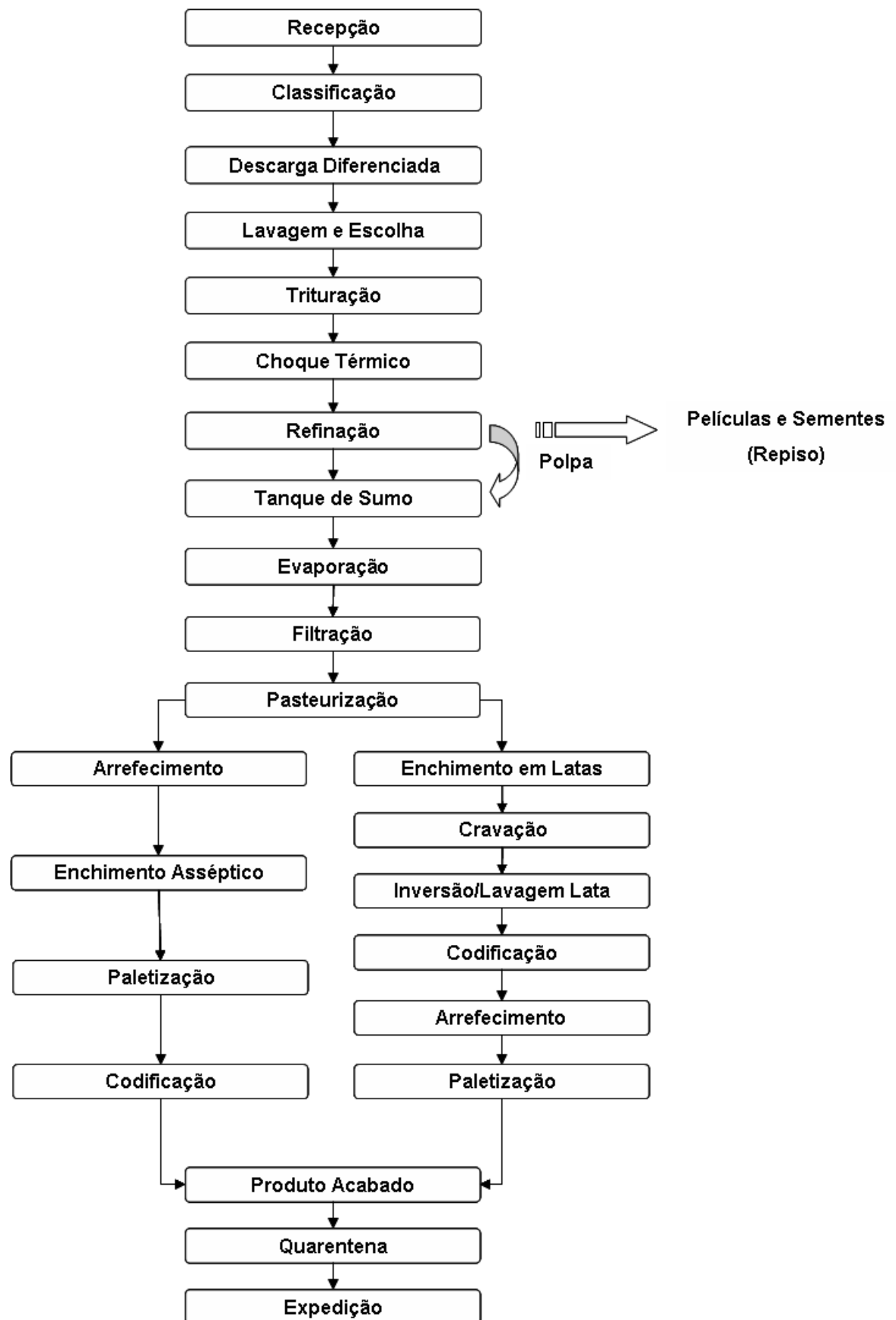


Fig. 4.1: Diagrama de processo do concentrado de tomate



## 4.2. Repiso de Tomate

O repiso de tomate é constituído essencialmente por películas, sementes e material celuloso, podendo também conter uma percentagem mínima de polpa de tomate. Um estudo conduzido por Del Valle *et al.* (2006) concluiu que a composição química do repiso de tomate, em relação à sua matéria seca, é a seguinte: 59,03% de fibra, 25,73% de açúcares totais, 19,27% de proteína, 7,55% de pectinas, 5,85% de gordura total e 3,92% de minerais.

Em Portugal, durante as campanhas de 2007 e 2008, foram processadas 1100000 toneladas de tomate por ano, com vista à produção de concentrado de tomate. Tendo em conta que cerca de 5% deste tomate resulta em repiso, chega-se a um valor de 55000 toneladas deste subproduto por ano. Se a isto tudo juntarmos o facto de as campanhas decorrerem apenas durante 2 a 3 meses do ano (Julho, Agosto e Setembro), as fábricas de concentrado de tomate vêm-se obrigadas a escoar grandes quantidades de repiso por campanha. Assim, este subproduto representa um sério problema de contaminação ambiental para a indústria, o que pode elevar os custos de produção (Campos *et al.*, 2007).

Como este material é geralmente propenso a degradação microbiológica, isto limita uma exploração futura. Por outro lado, o custo da secagem, armazenagem e transporte de subprodutos são factores economicamente limitantes. Por isso, os resíduos industriais são muitas vezes utilizados como ração animal ou na forma de fertilizantes (Kobori e Jorge, 2005). O repiso de tomate tem sido utilizado principalmente para a alimentação de ruminantes, sendo que a utilização deste subproduto na dieta de suínos e aves também tem sido estudada há vários anos (Campos *et al.*, 2007). O interesse da indústria animal por este subproduto deve-se essencialmente ao elevado valor protéico, aproximadamente 20% (Ibrahim e Alwash, 1983).

O facto de ter na sua constituição uma percentagem considerável de película de tomate, faz do repiso uma importante fonte de licopeno, que deveria ser valorizada. Assim, a extracção de licopeno a partir deste subproduto, para futura utilização na indústria alimentar ou farmacêutica, surge como uma solução viável.

## 5. Metodologias de Extracção de Licopeno

### 5.1. Metodologias Convencionais

Devido à grande instabilidade do licopeno, a extracção, armazenamento, manuseamento e análise do mesmo deve ser realizada em condições ambientais controladas, de forma a minimizar as perdas devido às reacções de oxidação e isomerização.

O processo de extracção mais utilizado para a obtenção de licopeno consiste na extracção/quantificação sólido/líquido por solventes. Os solventes mais utilizados neste tipo de extracção são a acetona, o éter petróleo, o clorofórmio e o hexano (Choksi e Joshi, 2007).

Recentemente Choksi e Joshi (2007) propuseram um método de extracção/quantificação de licopeno utilizando uma solução contendo 30% de hidróxido de potássio em metanol como solvente. O método proposto consiste em adicionar o solvente ao produto de tomate e, após agitação da mistura durante um determinado período de tempo, deixar em contacto a 5°C, ao abrigo da luz, durante uma noite. Em seguida proceder à filtração sob vácuo da fase saponificada da pasta. Efectuar lavagens sucessivas do bolo de filtração obtido com água destilada e acetona até que fique quase completamente incolor.

Os processos de extracção por solventes, para além de demorados e poluentes podem deixar resíduos de solvente nos extractos obtidos. Assim, solventes orgânicos como a acetona e outros hidrocarbonetos, muitas vezes utilizados na extracção de componentes naturais a partir de material vegetal, precisam de ser removidos no final da extracção, através de processos como a destilação ou a evaporação. Estes processos para além de tornarem a extracção mais dispendiosa, não garantem a remoção total dos resíduos de solvente e podem conduzir à alteração da actividade biológica do licopeno (Shi *et al.*, 2007). Assim, surge a necessidade de encontrar processos alternativos de extracção.

## 5.2. Extracção por Fluidos Supercríticos

O consumidor actual está cada vez mais alertado para os perigos de contaminação dos alimentos e a legislação proíbe já um vasto número de solventes na extracção de produtos para fins alimentares. A extracção por fluidos supercríticos surge assim na indústria alimentar como uma alternativa à extracção por solventes líquidos. Entre as principais utilizações desta metodologia de extracção na indústria podemos encontrar:

- Extracção de alcalóides:
  - Cafeína do café e do chá,
  - Lupanina do tremçoço,
  - Teobromina do cacau,
  - Limonina de citrinos;
- Extracção de aromas;
- Extracção de pigmentos;
- Fraccionamento de gorduras animais.

As principais vantagens da utilização de fluidos supercríticos na extracção de produtos naturais para fins alimentares são enumeradas nos pontos seguintes (Shi *et al.*, 2007):

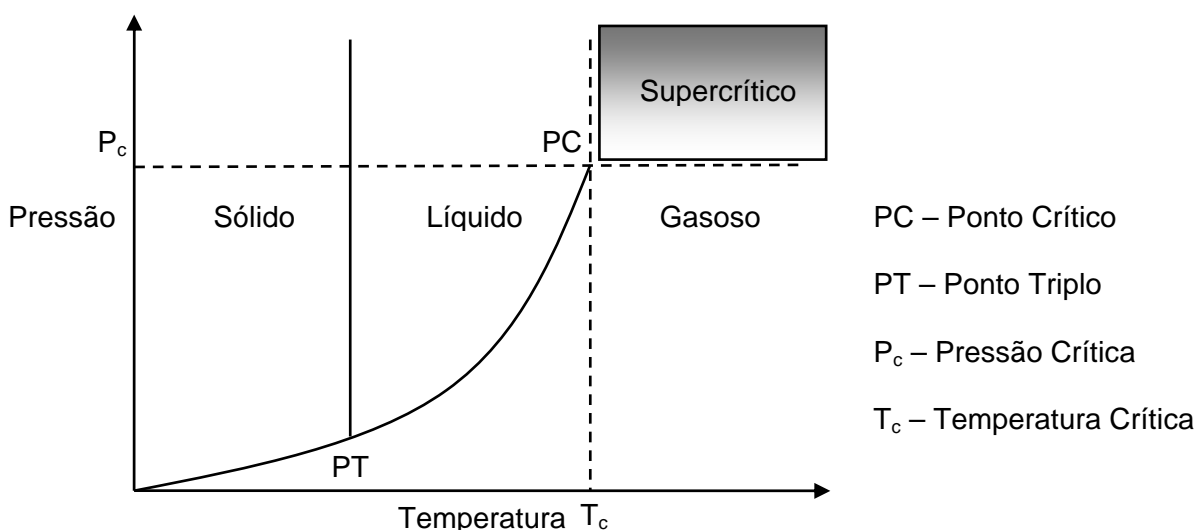
- Tempos de extracção curtos, quando comparados com os tempos de extracção por solventes;
- Obtenção de produtos finais sem resíduos de solvente;
- Temperaturas de extracção baixas o que permite o tratamento de amostras termolábeis, minimizando assim as perdas de aroma, cor e valor nutricional dos produtos;
- Pequenas variações da pressão ou temperatura permitem a modificação da selectividade e da capacidade de penetração dos fluidos na matriz;
- Permite proceder a uma extracção fraccionada;
- Proporciona a produção de novos alimentos;
- Possibilidade de impedir a entrada de oxigénio no sistema, prevenindo as reacções de oxidação e consequente degradação do produto;
- Apresenta facilidade de separação do fluido, por uma simples variação de pressão e/ou temperatura;

- A grande maioria dos fluidos utilizados neste tipo de extração está acessível numa forma relativamente pura e a preços razoáveis, quando comparados com os solventes líquidos;
- Possibilidade de ligar um cromatógrafo ao extractor, facilitando a análise dos extractos;
- Permite uma extração sem riscos ambientais, pois os fluidos utilizados podem ser recolhidos e reciclados de uma forma segura.

Apesar das inúmeras vantagens que este tipo de extração apresenta, nomeadamente no domínio alimentar, existem também alguns pontos menos positivos. Desde logo os custos elevados do equipamento e a sua respectiva manutenção. A possibilidade de perda de componentes voláteis e as altas pressões de trabalho são também algumas das desvantagens desta metodologia. Outra desvantagem importante é a relativa complexidade dos sistemas termodinâmicos, especialmente em sistemas com misturas complexas.

### 5.2.1. Fundamentos da Extração com Fluidos Supercríticos

Na **Fig. 5.1** apresenta-se um diagrama de fases típico para uma substância pura. Neste diagrama são visíveis três regiões bem diferenciadas, que correspondem aos três estados da matéria: sólido, líquido e gasoso. Estas regiões estão separadas por curvas de coexistência de duas fases: sólido-líquido, sólido-gás e líquido-gás correspondentes aos equilíbrios de fusão, sublimação e vaporização, respectivamente. Estas curvas encontram-se no ponto triplo, no qual se verifica a coexistência das três fases.



**Fig. 5.1: Diagrama de fases de uma substância pura**

Considera-se ponto crítico o ponto que no diagrama de fases é definido por uma temperatura crítica ( $T_c$ ) e por uma pressão crítica ( $P_c$ ), acima do qual a fase líquida e a fase gasosa se tornam indistintas – zona supercrítica. Nesta zona o aumento da pressão não origina liquefacção e com o aumento da temperatura não se obtém um gás (Martins, 1995). A extracção por fluidos supercríticos pode considerar-se uma extracção por solvente em que este se encontra em condições de pressão e temperatura acima do seu ponto crítico.

### **5.2.2. Características dos Fluidos Supercríticos**

O facto dos fluidos supercríticos possuírem densidade próxima da dos líquidos, confere-lhes um poder solvente semelhante a estes, o que favorece a interacção entre moléculas do solvente e do soluto. Na proximidade do ponto crítico, a densidade depende dos valores de pressão e de temperatura. A temperatura constante, um aumento da pressão favorece a interacção das moléculas do soluto com o solvente, ou seja aumenta o poder solvente do fluido supercrítico. Pelo contrário, quando se mantém a pressão constante, com o aumento da temperatura observa-se uma diminuição do respectivo poder solvente.

Os valores de viscosidade na região supercrítica são intermédios entre os dos líquidos e os dos gases, o que confere ao fluído boas propriedades hidrodinâmicas. Os coeficientes de difusão dos fluidos supercríticos são também eles intermédios entre os dos gases e os dos líquidos, o que facilita os fenómenos de transferência de massa. No que diz respeito à tensão superficial dos fluidos supercríticos, esta é muito baixa, permitindo desta forma uma melhor penetrabilidade através das matrizes a extrair.

### **5.2.3. Dióxido de Carbono como Fluido Supercrítico**

Existem no mercado vários solventes com aplicação em extracções supercríticas, mas apenas alguns são recomendáveis para obtenção de produtos com fins alimentares. Os fluidos supercríticos mais utilizados na indústria alimentar são, o álcool etílico, a água e o dióxido de carbono (Shi *et al.*, 2007).

No entanto há um fluido que se destaca dos restantes, não só para utilização na indústria mas também a nível da investigação. Trata-se do dióxido de carbono. Vários são os factores que fazem do  $\text{CO}_2$  o fluido supercrítico mais utilizado neste tipo de extracções, este facto deve-se às inúmeras vantagens que apresenta (Martins, 1995; Trigo, 1997; Shi *et al.*, 2007):

- Não é tóxico;
- Fácil de obter com elevado grau de pureza;
- Não é inflamável;
- Fácil eliminação do solvente;
- Não é agressivo para o ambiente;
- Preço acessível;
- Não é corrosivo;
- Tem um poder solvente selectivo;
- Pressão e temperatura críticas relativamente baixas (7,38MPa; 31,1°C), permitindo a extracção de compostos termolábeis e diminuindo os custos de compressão do gás.

#### **5.2.4. Extracção de Carotenóides por CO<sub>2</sub> Supercrítico**

A solubilidade de um composto define-se pela quantidade de soluto que é possível dissolver numa determinada quantidade de solvente, ou seja, representa o limite superior que um solvente consegue suportar quando fica saturado. Na extracção supercrítica o tamanho e a forma das moléculas afecta os fenómenos de solubilidade, permeabilidade, difusão e resistência química. Moléculas pequenas e uniformes são ideais, pois aliam uma elevada solubilidade a uma rápida difusão. A solubilidade de muitos compostos é aproveitada pela extracção supercrítica, pois uma mudança súbita das condições de extracção (pressão e temperatura) reduz essa mesma solubilidade e permite separar o soluto do fluido supercrítico. Assim, a solubilidade das moléculas a extrair e o tipo de fluido supercrítico utilizado vão influenciar o rendimento da extracção (Shi *et al.*, 2007).

Na extracção supercrítica, a natureza dos compostos a extrair tem influência directa na escolha do solvente. O CO<sub>2</sub> supercrítico favorece a extracção de compostos lipofílicos apolares, onde se englobam, entre outros, os carotenóides. Existem vários factores que afectam a solubilidade dos carotenóides em fluidos supercríticos. Os principais factores são sem dúvida a pressão e a temperatura de extracção, mas outros parâmetros como o caudal de solvente, presença de co-solventes, condições de armazenamento, tempos de extracção, humidade da matriz a extrair e morfologia do composto, devem também ser considerados (Shi *et al.*, 2007).

Está provado que um aumento de pressão a temperatura constante favorece o poder solvente do CO<sub>2</sub> supercrítico. Este facto constitui uma vantagem, pois permite aumentar o rendimento de extracção de carotenóides a temperaturas relativamente baixas, evitando a degradação destes. Johannsen e Brunner (1997) demonstraram que o poder solvente do CO<sub>2</sub> aumenta à medida que a sua densidade também aumenta. Este aumento de densidade permite a extracção de uma gama mais abrangente de carotenóides, dos quais se podem destacar o licopeno, o  $\alpha$ -caroteno e o  $\beta$ -caroteno (Shi *et al.*, 2007).

Na extracção supercrítica é muito importante conhecer a temperatura a partir da qual os nossos compostos se começam a degradar. O licopeno, por exemplo, torna-se bastante instável a partir dos 120°C, embora a sua degradação se inicia muito antes. Deste modo não se deve aumentar muito a temperatura de extracção com o intuito de aumentar a solubilidade dos carotenóides em CO<sub>2</sub> supercrítico, pois pode levar uma degradação dos mesmos, diminuindo o rendimento da extracção. Os efeitos da temperatura neste tipo de extracção são muito mais difíceis de aferir que os da pressão. Spanos *et al.* (1993) observaram um aumento no rendimento da extracção de  $\beta$ -caroteno a baixas temperaturas quando efectuada a uma pressão também ela baixa (13,8MPa), pelo contrário, a pressões mais elevadas (41,4MPa) observaram que quanto mais elevada era a temperatura, maior o rendimento de extracção. Este comportamento pode ser explicado por um balanço complexo entre a densidade do CO<sub>2</sub> e a pressão de vapor do soluto à medida que a temperatura aumenta (Shi *et al.*, 2007).

A solubilidade de certos compostos orgânicos pode ser aumentada adicionando co-solventes ao solvente supercrítico propriamente dito. Um co-solvente é um componente que é adicionado em pequenas quantidades (1-10% m/m), com uma volatilidade intermédia entre a do solvente e a do soluto, e que não modifica nem as propriedades críticas nem a densidade do solvente (Esquível, 1994). Uma das vantagens da extracção supercrítica é a de produzir extractos sem qualquer tipo de toxicidade, pelo que a adição de co-solventes orgânicos tóxicos como hexano, clorofórmio ou acetona, está fora de questão. Assim, os co-solventes mais utilizados em extracções supercríticas para obtenção de produtos com fins alimentares são o etanol e os óleos vegetais.

Na extracção supercrítica o caudal de CO<sub>2</sub> tem uma grande influência no rendimento da extracção. Quanto maior o fluxo de fluido supercrítico, maior será o rendimento da extracção. A extracção de carotenóides por este método não é excepção, quanto maior for a quantidade de CO<sub>2</sub> consumida, maior será o rendimento obtido (Shi *et al.*, 2007).

Outro factor que pode afectar o rendimento de extracção de carotenóides por CO<sub>2</sub> supercrítico é a composição do material de partida. Por exemplo, a extracção de carotenóides a partir de uma solução sintética tem resultados completamente diferentes da extracção desses mesmos carotenóides a partir de material vegetal. A estrutura celular existente no material vegetal pode levar a uma diminuição do rendimento no processo de extracção. Para ultrapassar este efeito negativo, podem ser tomadas medidas como a adição de co-solventes ou a redução do tamanho das partículas do material vegetal. Quanto menor o tamanho das partículas da amostra, maior será o extracto obtido. O grau de trituração sofrido pelo material vegetal vai assim afectar a quantidade de carotenóides extraídos, pois uma maior maceração leva a um número mais elevado de paredes celulares quebradas, libertando mais pigmentos. Um estudo desenvolvido por Sun e Temelli (2006) mostra que as partículas entre os 0,25 e 0,5 mm deram origem a concentrações de luteína,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno mais elevadas.

A concentração de carotenóides em material de origem vegetal diminui ao longo do tempo. A forma como as amostras são conservadas vai influenciar a degradação do material. Factores como o tamanho das partículas, temperatura e humidade devem ser considerados. No caso da conservação de produtos vegetais, quanto maior o tamanho das partículas das amostras, menos degradação elas sofrem, e por conseguinte maiores rendimentos de extracção se obtêm. Outro factor a ter em conta na conservação de material vegetal para posterior extracção dos seus carotenóides é a luz. Sabe-se que a maioria dos carotenóides, incluindo o licopeno, são fotossensíveis (Shi *et al.*, 2007).

Quando se optimiza as condições de um processo de extracção, o tempo de extracção é um parâmetro de grande importância. Diminuir o tempo de extracção enquanto se maximiza o rendimento é fulcral do ponto de vista de custos. Na extracção de licopeno por CO<sub>2</sub> supercrítico, Baysal *et al.* (2000) concluíram que o rendimento máximo foi obtido entre a primeira e segunda hora de extracção. Períodos de tempo inferiores a 1 hora não permitem a total dissolução dos carotenóides no fluido supercrítico, enquanto que tempos de extracção superiores a 2 horas levam a uma maior degradação destes. O binómio tempo/temperatura está directamente relacionado com o grau de isomerização e degradação dos carotenóides, assim, torna-se muito importante reduzir ao máximo os tempos de extracção (Shi *et al.*, 2007).



Em material vegetal, aproximadamente 80 a 90% da sua massa total corresponde à água. A quantidade de água da amostra influencia também o rendimento em extracções por CO<sub>2</sub> supercrítico. Neste sentido o processo de secagem toma um papel muito importante e deve anteceder a extracção propriamente dita. A secagem do material não deve no entanto ser agressiva para os compostos que se pretende extrair. Como já foi referido os carotenóides são termolábeis pelo que a secagem do material a temperaturas elevadas é de evitar. A liofilização surge assim como uma opção válida, embora mais dispendiosa. Nesta operação o material vegetal é congelado e posteriormente submetido ao vácuo total, fazendo com que ocorra um fenómeno de sublimação da água, passando esta directamente do estado sólido para o estado gasoso (Shi *et al.*, 2007).

## 6. Desenvolvimento Experimental

Como já foi referido, o presente estudo tem como objectivo a valorização do tomate de origem nacional. O desenvolvimento experimental incluiu duas etapas consecutivas e complementares:

1. Na primeira fase procedeu-se à análise físico-química e sensorial de tomate nacional e espanhol para indústria, no sentido de proceder a uma caracterização, ainda que sumária, e poder inferir sobre o interesse, ou não, de prosseguir para a valorização de subprodutos.

2. Na segunda fase, e porque os teores de licopeno assim o justificaram, procedeu-se a uma extracção de licopeno por CO<sub>2</sub> supercrítico a partir de um subproduto da indústria de concentrado de tomate.

### 6.1. Caracterização Físico-Química e Sensorial do Tomate

Para esta fase do desenvolvimento experimental analisou-se tomate para indústria de origem nacional e de origem espanhola com grau de maturação semelhante. Analisaram-se parâmetros como a cor, textura, acidez total titulável, teor de ácido ascórbico, teor de sólidos solúveis, pH e humidade. A cor e a textura foram analisadas com o tomate inteiro, enquanto que para os restantes parâmetros se procedeu a uma trituração e homogeneização prévia do tomate de cada origem. A par destas análises físico-químicas efectuou-se também uma análise sensorial do tomate com painel de provadores treinado.

#### 6.1.1. Material e Métodos

**Cor** – A análise de cor efectuou-se através do colorímetro Minolta CR-300 com sistema colorimétrico CIE Lab, tendo-se posteriormente calculado os parâmetros “C” e “h” Neste sistema o “L” representa o brilho da amostra e varia entre 0, correspondente ao preto e 100, correspondente ao branco. O parâmetro “C” mede o croma ou saturação da cor, enquanto que o “h” mede a tonalidade, ou seja, a coloração básica da amostra. Os valores de “h” são medidos em ângulo e variam entre 0° e 360°. As cores dos principais carotenóides presentes no tomate variam entre os 0° e os 90° e representam os vermelhos,

laranjas e amarelos. A título de exemplo, um vermelho considerado brilhante apresenta os seguintes valores LCh: L=43,70; C=41,55 e h=26,80°. A análise incidiu sobre 10 frutos de cada uma das amostras iniciais, aleatoriamente seleccionados. Em cada um desses 10 frutos efectuaram-se 3 leituras na zona equatorial.

**Textura** – Para esta avaliação utilizou-se o texturómetro TA-XT2 da Stable Micro Systems. A textura foi determinada aplicando um teste de penetração até 4mm, com uma sonda cilíndrica de aço com 2mm de diâmetro, à temperatura de 20°C e à velocidade de 1mm/s. Os resultados desta determinação medem a força máxima aplicada ao fruto até a película exterior quebrar e são expressos em Newton. Para esta análise retiraram-se, mais uma vez, 10 frutos ao acaso de cada uma das amostras iniciais e efectuaram-se 3 medições na zona equatorial de cada um deles.

**Humidade** – A humidade da amostra foi determinada a partir do tomate triturado e homogeneizado, por gravimetria a 105°C em estufa com circulação de ar, até atingir massa constante, de acordo com o método AOAC (1995). Para esta análise efectuaram-se 3 repetições para cada uma das amostras iniciais.

**Teor de Sólidos Solúveis (TSS)** – A análise dos sólidos solúveis presentes no tomate efectuou-se a partir da amostra de tomate triturado e homogeneizado. Neste método colocaram-se duas a três gotas da amostra no prisma do refractómetro digital CETI Brix-040 e leu-se directamente o valor em °Brix. Efectuaram-se 3 leituras para cada uma das amostras iniciais.

**pH** – O pH determinou-se na amostra triturada utilizando um potenciómetro digital Metrohm-645 pH Meter, sendo os resultados expressos em unidades de pH (AOAC, 1995). Foram realizadas 3 leituras em cada uma das amostras de tomate.

**Acidez Titulável Total** – A acidez total foi determinada segundo o método de referência número 22060 da AOAC, 1995. Segundo o método, misturaram-se 10g de amostra com 90mL de água destilada que em seguida foram tituladas, sob agitação, utilizando uma solução 0,01N de hidróxido de sódio (NaOH) padronizado, até se atingir coloração rósea tendo como indicador a fenolfetaleína 1%. Os resultados são expressos em mg de ácido cítrico por 100g de amostra. Mais uma vez realizaram-se 3 repetições para cada uma das amostras iniciais.

**Teor de Ácido Ascórbico** – Para determinar o teor de vitamina C pesou-se 10g de amostra triturada e homogeneizada e diluiu-se em 90mL de ácido oxálico 0,4%. Após agitação para homogeneização, tomou-se uma alíquota de 2mL para um balão Erlenmeyer de 125mL e adicionou-se 50mL de água destilada, que na sequência foi titulado com reagente de Tillmans (2,6 diclorofenol-indofenol) até a obtenção de uma coloração ligeiramente rosada e estável por 15 segundos, tendo como indicador fenolfetaleína 1%. Os teores de ácido ascórbico das amostras foram calculados tomando-se por base uma curva padrão de ácido ascórbico previamente estabelecida. Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico por 100g de amostra (Pregnotatto e Pregnotatto, 1985). Realizaram-se 3 repetições para cada uma das amostras iniciais.

**Teor de Fibra** – O teor de fibra bruta foi determinado segundo o método de Weende, que se baseia na dissolução da amostra, sucessivamente em solução ácida, básica e com acetona. O resíduo não dissolvido constitui a fibra. Pesou-se 1g de amostra ( $w_0$ ) devidamente triturada para um cadinho de vidro de fundo filtrante. Em seguida procedeu-se à hidrólise ácida, no aparelho Dosi-Fiber. Adicionaram-se 100mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a 0,128M, previamente aquecido a 95°, a cada coluna do aparelho por cima dos cadinhos. Seguidamente foram adicionadas 6 gotas de anti-espuma. Após entrada em ebulição, a digestão ocorre durante 30 minutos, tempo a partir do qual se dá início à lavagem dos cadinhos com água destilada sob vácuo. Seguiu-se então a hidrólise básica onde foi repetido o procedimento acima descrito mas com a adição de uma solução de hidróxido de potássio (KOH) a 0,223M. Seguiu-se a extração a frio com acetona. Retiraram-se os cadinhos do aparelho Dosi-Fiber e colocaram-se num Kitassato ligado a uma trompa de vácuo. Efectuaram-se 3 lavagens com 25mL de acetona. Seguidamente secaram-se os cadinhos em estufa a 150°C durante 2 horas e pesaram-se após arrefecimento em excicador ( $w_1$ ). O último passo deste método foi colocar os cadinhos numa mufla a 500°C durante 4 horas e pesar novamente após arrefecimento em excicador ( $w_2$ ). A percentagem de fibra bruta da amostra foi obtida através da equação 6.1. Nesta análise foram feitas 3 repetições.

$$\%Fibra\ Bruta = 100 \times (w_1 - w_2) / w_0 \text{ (Eq. 6.1)}$$

**Fenóis Totais** – A determinação dos fenóis totais efectuou-se segundo o método descrito por Slinkard e Singleton (1977), mas utilizando volumes mais pequenos. Esta análise foi realizada a partir da amostra triturada e homogeneizada, que sofreu um tratamento prévio. Pesaram-se 0,75g da amostra inicial e maceraram-se, com a ajuda de areia, em 2mL de metanol contendo 0,1% de ácido clorídrico. Em seguida deixou-se o

extracto sob agitação durante uma noite e ao abrigo da luz. No dia seguinte centrifugou-se o extracto durante 10 minutos a 7000 rpm. Após centrifugação, concentrou-se o extracto obtido em evaporador rotativo a 50°C para determinar o teor de fenóis totais. Feita a preparação da amostra retiraram-se 20µL de extracto obtido aos quais se juntaram 1,58mL de água destilada e agitou-se durante 10 segundos. Seguidamente adicionaram-se 100µL de reagente Folin-Ciocalteu e agitou-se de novo durante 10 segundos. Após 3 minutos adicionou-se 3mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e deixou-se repousar durante 2 horas. No final desse tempo leu-se a absorvância da amostra num espectrofotómetro Shimadzu AA-6300, a 760nm de comprimento de onda. O teor de fenóis totais da amostra foi calculado tomando-se por base uma curva padrão de ácido gálico previamente estabelecida (**Anexo I**).

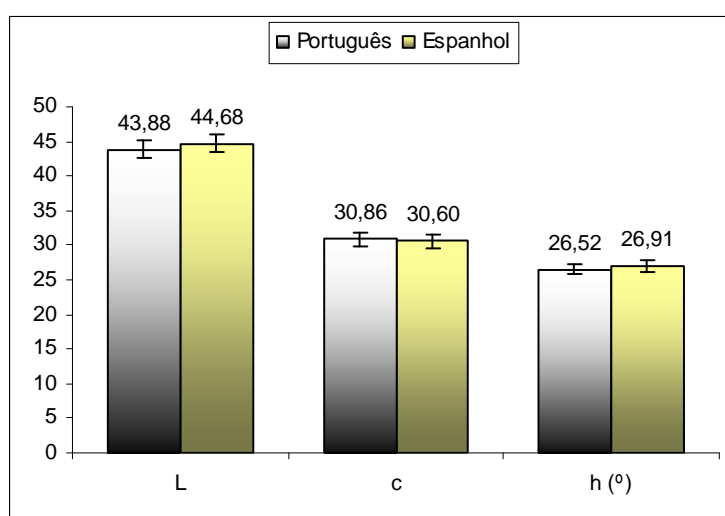
**Teor de Licopeno** – A determinação do teor de licopeno baseou-se no método descrito por Porter e Zscheile (1947), com algumas modificações. Neste procedimento a amostra de tomate triturada e homogeneizada sofreu uma série de lavagens sucessivas utilizando uma solução hexano/acetona 9:1 (v/v) em sistema de vácuo. O extracto obtido foi então submetido a uma leitura em espectrofotómetro no comprimento de onda de máxima absorção por parte do licopeno, ou seja 475nm. Os resultados desta determinação foram expressos em mg de licopeno por 100g de amostra.

**Análise Sensorial** – A análise sensorial do tomate efectuou-se no laboratório de análise sensorial do departamento de Agro-Indústrias e Agronomia Tropical do Instituto Superior de Agronomia. As amostras de tomate foram avaliadas quanto à sua aparência, aroma, sensação na boca e sabor. Os parâmetros de avaliação da aparência foram a cor e os defeitos enquanto que para o aroma foram avaliados dois tipos: o aroma característico e o aroma estranho. Em relação à sensação na boca os parâmetros de avaliação foram a suculência da polpa e a sensação “farinhenta”. Para definir o sabor, os parâmetros avaliados pelos provadores foram o sabor característico, doce e ácido. O propósito desta análise foi traçar um perfil sensorial do tomate português e espanhol. Para esta prova foram recrutados 20 provadores, que receberam orientação prévia para a realização da avaliação. A equipa de provadores pertencentes a diferentes faixas etárias e géneros, declarou-se consumidora de tomate em fresco. Utilizou-se uma escala de 1 a 5 para definir os vários parâmetros de qualidade do tomate, dividida do seguinte modo: 1 – intensidade muito fraca; 2 – intensidade fraca; 3 – intensidade média; 4 – intensidade forte e 5 – intensidade muito forte. Cada provador efectuou 2 provas, uma para o tomate português e outra para o tomate espanhol, e registou os resultados numa ficha de análise (**Anexo II**). As amostras de tomate foram servidas em pratos de plástico brancos, contendo aproximadamente 30g de tomate disposto em gomos (2-3).

### 6.1.2. Resultados e Discussão

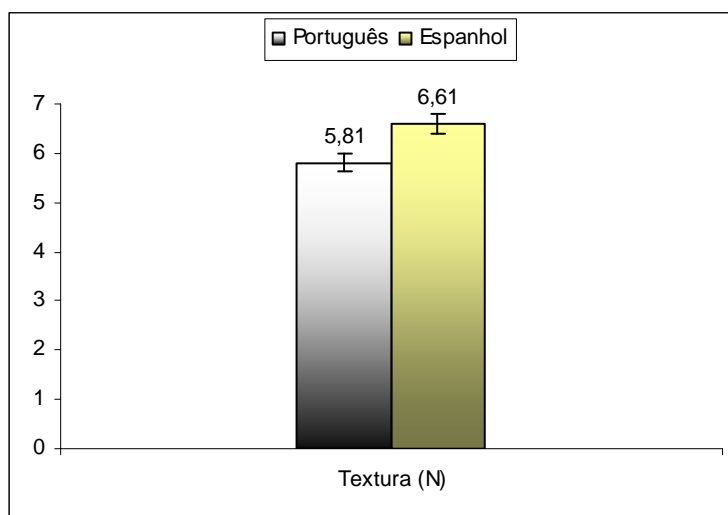
Os resultados da análise físico-química (**Anexo III**) e sensorial (**Anexo IV**) foram submetidos a análise de variância ANOVA no programa Statistica 6.1. Para a análise das médias de grupos grandes e de dimensões diferentes utilizou-se o teste de contraste de Scheffé a 95% de confiança, enquanto que para a análise das médias de grupos pequenos e de dimensão semelhante se utilizou o teste Fisher LSD, também a 95% de confiança.

Na **Fig. 6.1** são apresentados os valores da análise objectiva da cor, LCh, para as duas origens de tomate. Ambas as amostras apresentam valores de LCh bastante próximos, confirmando assim que os frutos se encontravam num estado de maturação semelhante. As condições edafo-climáticas em Portugal e Espanha são bastante idênticas, caracterizando-se por um clima mediterrâneo, factor que também explica as diferenças mínimas encontradas na cor. No que diz respeito ao parâmetro “L”, que representa o brilho da amostra, o tomate espanhol apresenta um brilho mais intenso que o tomate português. No entanto, o tomate de origem portuguesa apresenta uma cromaticidade “C” superior ao tomate de origem espanhola. O parâmetro “h” define a coloração básica das amostras, que em tomate pode variar entre os 90° (amarelos) e os 25° (vermelhos). Em ambas as amostras os valores de “h” encontram-se na zona dos vermelhos, característicos de frutos maduros. O valor de “h” mais baixo indica uma cor ligeiramente mais intensa por parte do tomate português, podendo indicar uma maior concentração de licopeno em relação ao tomate espanhol.



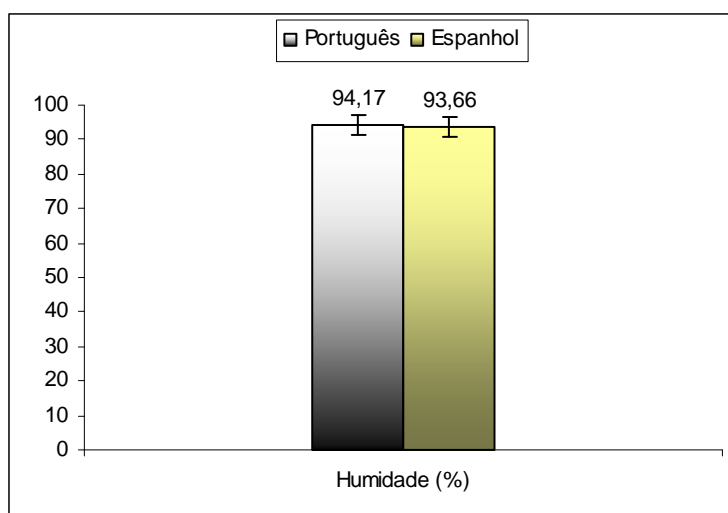
**Fig. 6.1: Parâmetros LCh da cor de tomate fresco**

A textura é definida como o conjunto de características físicas do alimento, perceptíveis pelo tacto e que se relacionam com a deformação, desintegração e fluxo do alimento, sob a aplicação de uma força. Na **Fig. 6.2** apresentam-se os valores da textura para o tomate das duas origens em estudo. Verifica-se que o tomate espanhol apresenta uma firmeza mais elevada (6,61N) que o tomate português (5,81N). A firmeza está fortemente correlacionada com o conteúdo de pectina presente nos frutos. À medida que os frutos amadurecem ocorre degradação das substâncias pécticas, levando ao amolecimento da polpa. O facto de o tomate de ambas as origens se encontrar num estado de maturação intermédio explica os valores obtidos. Um estudo conduzido por Vanegas (1987) verificou a resistência do tomate à compressão durante o amadurecimento. As amostras de tomate, mantidas a 15°C, resistiram a uma força de ruptura média de 14,5N no primeiro dia, diminuindo para os 1,69N no final da maturação.



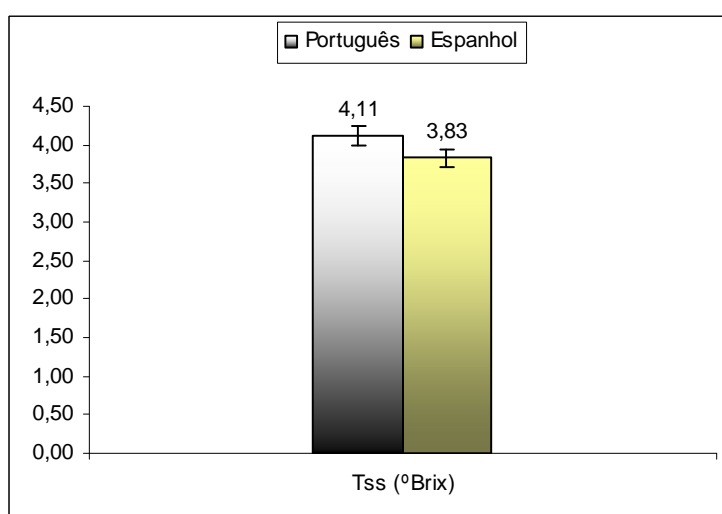
**Fig. 6.2: Textura de tomate fresco**

Os valores apresentados na **Fig. 6.3** revelam um teor de humidade muito próximo por parte dos frutos estudados. O teor de humidade do tomate português é ligeiramente superior ao apresentado pelo tomate espanhol, 94,17% e 93,66% respectivamente. Segundo vários autores o teor médio de humidade do tomate fresco ronda os 94%, valor adoptado como referência. Borguini (2002) obteve valores de humidade entre os 93,73% e os 94,53% para as amostras de tomate, enquanto Ferreira (2004) registou teores de humidade entre os 94,27% e os 94,80%.



**Fig. 6.3: Teor de humidade de tomate fresco**

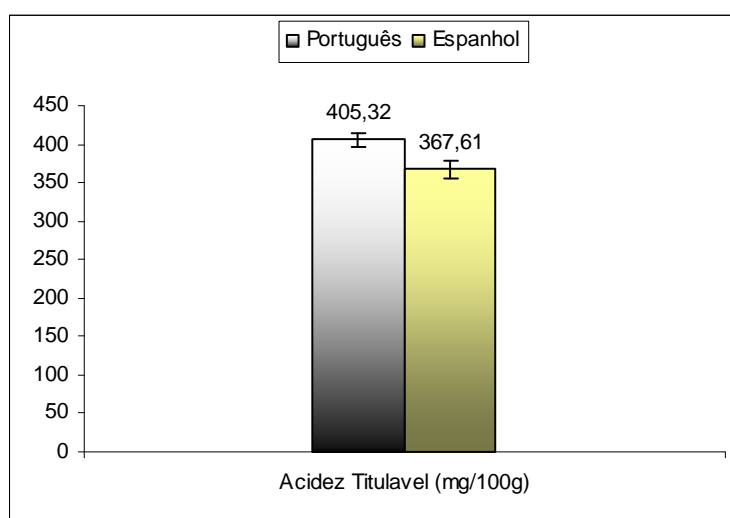
O teor de sólidos solúveis (TSS) das amostras de tomate analisadas difere de forma significativa, segundo o teste Fisher LSD, a 95% de confiança. O tomate de origem portuguesa apresenta um TSS de 4,11°Brix enquanto que para o tomate espanhol se obteve um valor de 3,83°Brix (**Fig. 6.4**). Este parâmetro representa um dos índices de maturação dos frutos e traduz o grau de doçura de tomate fresco. Note-se que o teor de açúcares representa normalmente 60-85% do teor de sólidos solúveis totais. Análises efectuadas por Artés *et al.* (1998) em tomate com grau de maturação idêntico registaram um teor de sólidos solúveis de 4,05°Brix. Os resultados obtidos por Borguini (2002) apresentam teores de sólidos solúveis de 4,70 e 4,20°Brix.



**Fig. 6.4: Teor de sólidos solúveis de tomate fresco**

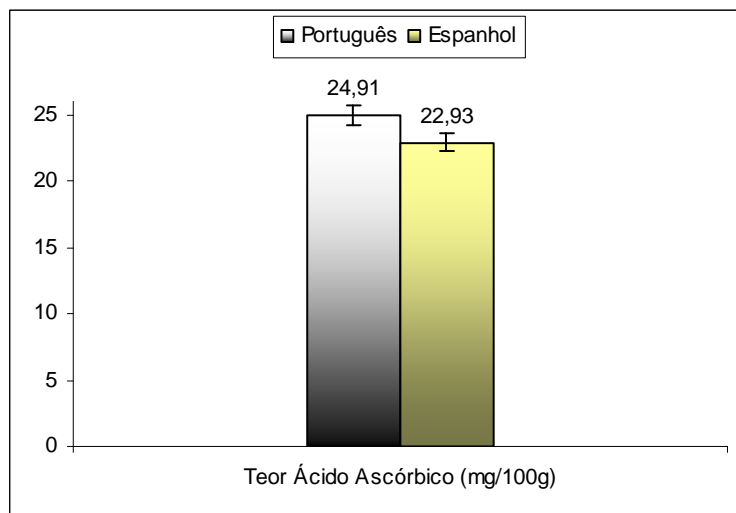


A acidez titulável total indica a quantidade de ácidos orgânicos presentes no tomate. Na **Fig.6.5** apresentam-se os resultados da análise da acidez titulável para o tomate em estudo, expressos em mg de ácido cítrico por 100g de amostra. As amostras analisadas diferem significativamente entre si, com 95% de confiança. Para o tomate de origem portuguesa registou-se um valor de 405,32 mg de ácido cítrico por 100g de amostra, enquanto que o tomate espanhol apresentou um valor de acidez significativamente mais baixo (367,61mg/100g). Os ácidos orgânicos são produtos intermediários do metabolismo respiratório dos frutos e definem o sabor bem como o aroma dos mesmos.



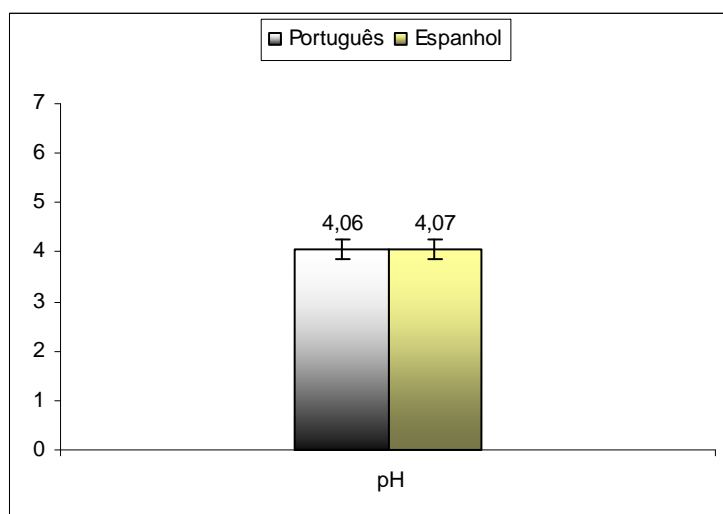
**Fig. 6.5: Acidez titulável de tomate fresco**

O teor de ácido ascórbico (**Fig. 6.6**) presente nas amostras de tomate não revelou diferenças significativas entre ambas, embora o tomate português (24,91mg/100g) tenha registado um valor ligeiramente superior ao tomate espanhol (22,93mg/100g). As principais perdas de nutrientes, nomeadamente de ácido ascórbico, ocorrem durante o armazenamento. Estes teores de ácido ascórbico podem-se considerar elevados quando comparados com os resultados obtidos por Moura *et al.* (1999), onde os valores se situaram entre os 10,73 e os 13,27 mg/100g. Já Borguini (2002) obteve teores de ácido ascórbico entre 21,9 e 28,9 mg/100g. Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam que o tomate em estado de maturação intermédio apresenta teores de ácido ascórbico bastante elevados.



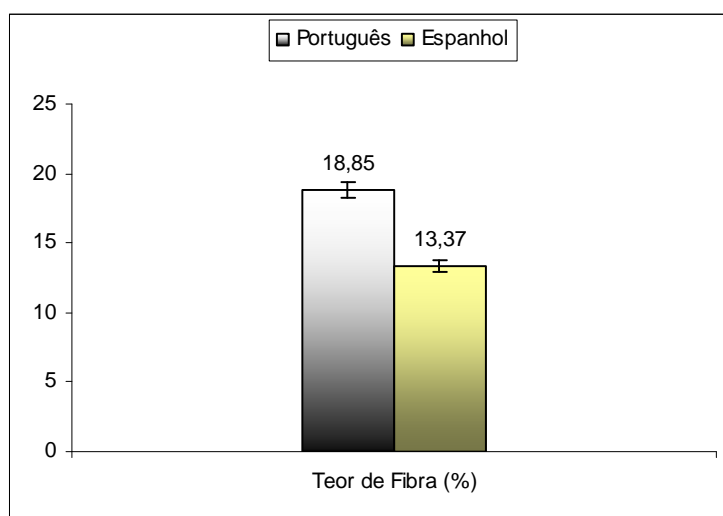
**Fig. 6.6: Teor de ácido ascórbico de tomate fresco**

A **Fig. 6.7** apresenta os valores de pH do tomate português e espanhol. Em ambos os casos o valor obtido foi muito próximo, 4,06 para o tomate de origem portuguesa e 4,07 para o tomate de origem espanhola. Estes valores são no entanto mais baixos que os registados por Artés *et al.* (1998), Borguini (2002) e Ferreira (2004). Os valores de pH obtidos nos referidos estudos foram respectivamente de 4,31 a 4,57, 4,30 a 4,40 e 4,31 a 4,78. A acidez e o pH são factores de extrema importância quando se analisa o nível de aceitação de um produto. Quando o tomate se revela excessivamente ácido é rejeitado para o consumo.

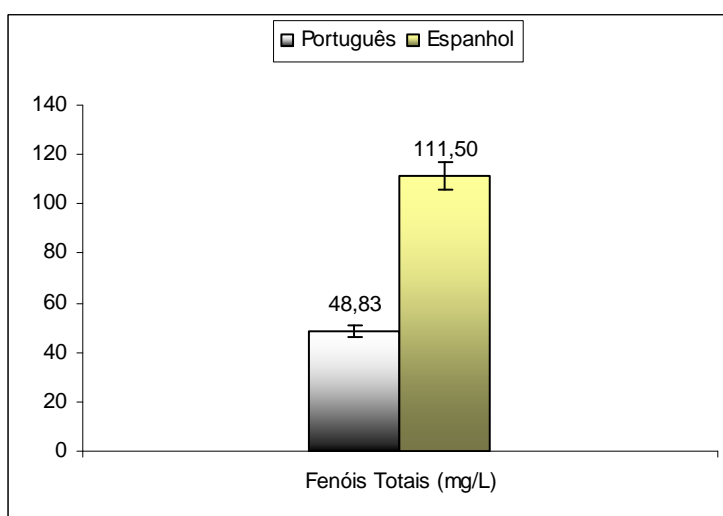


**Fig. 6.7: Análise de pH de tomate fresco**

As **Fig. 6.8 e 6.9** apresentam, respectivamente, o teor de fibra total e os fenóis totais presentes nas amostras de tomate estudadas. Em ambas as análises verificou-se a existência de diferenças significativas entre as amostras. O tomate português apresenta uma percentagem de fibra (18,85%) superior em relação ao tomate de origem espanhola (13,37%). Este parâmetro tem influência nas características sensoriais e nutricionais dos frutos. O teor de fenóis totais presentes no tomate espanhol (111,50mg/100g) revelou-se bastante superior em relação ao tomate português (48,83mg ácido gálico/100g).

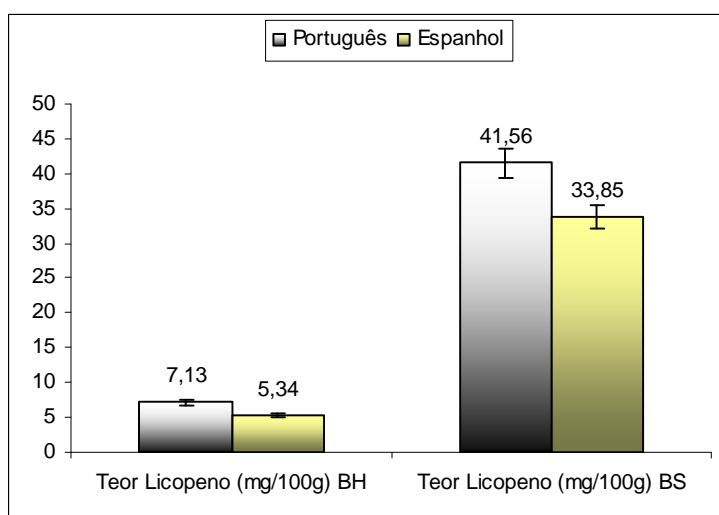


**Fig. 6.8: Teor de fibra de tomate fresco**



**Fig. 6.9: Fenóis totais de tomate fresco**

O teor de licopeno do tomate fresco, em base húmida, varia entre os 0,13mg/100g e os 20,00mg/100g (Shi *et al.* 2002). Os valores apresentados na **Fig. 6.10** revelam que o tomate ibérico tem teores de licopeno bastante elevados, com especial destaque para o tomate português (7,13mg/100g). No estudo realizado por Borguini (2002) o tomate analisado registou teores de licopeno consideravelmente mais baixos, entre os 3,50 e 3,90mg/100g. Os teores de licopeno total obtidos sustentam os resultados obtidos na análise de cor. Recorde-se que nessa análise o valor do parâmetro “h”, indicador da tonalidade, foi ligeiramente inferior no caso do tomate português, o que revela um vermelho mais intenso.



**Fig. 6.10: Teor de licopeno em base húmida e base seca de tomate fresco**

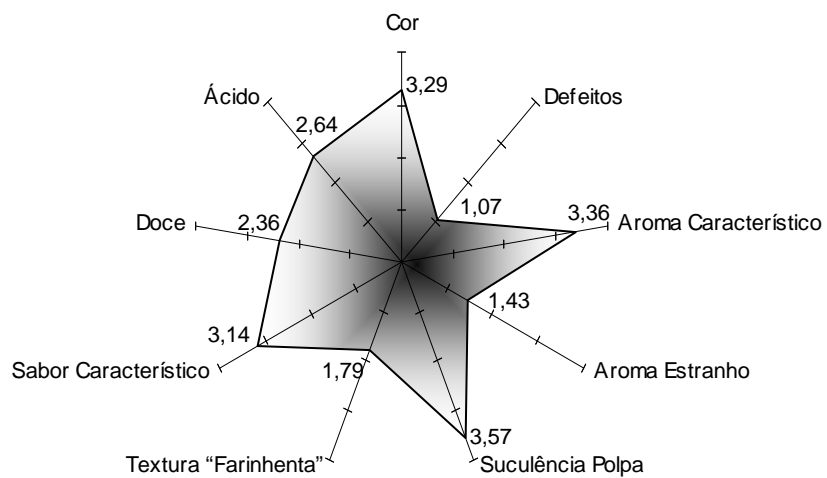
As **Fig. 6.11** e **6.12** apresentam o perfil sensorial do tomate português e espanhol respectivamente. Como seria de esperar, atendendo aos resultados das análises de cor e do teor de licopeno, o grupo de provadores atribuiu um valor médio mais elevado de cor (3,29) ao tomate português, em relação ao tomate espanhol (3,00). No que diz respeito aos defeitos da amostra, ambas obtiveram médias baixas. O tomate português ficou-se pelos 1,07 e o espanhol pelos 1,21, o que indica uma boa aparência visual por parte das amostras.

O aroma está directamente relacionado com a presença de ácidos orgânicos nos frutos, pois muitos destes são voláteis. A análise química da acidez titulável total foi superior no tomate português, o que indicaria um valor de aroma característico mais elevado que no tomate espanhol. No entanto, observou-se que os provadores atribuíram notas mais elevadas ao aroma característico do tomate espanhol, 3,71 contra os 3,36 do tomate português. O aroma estranho obteve notas médias baixas em ambas as amostras o que comprova o bom estado dos frutos.

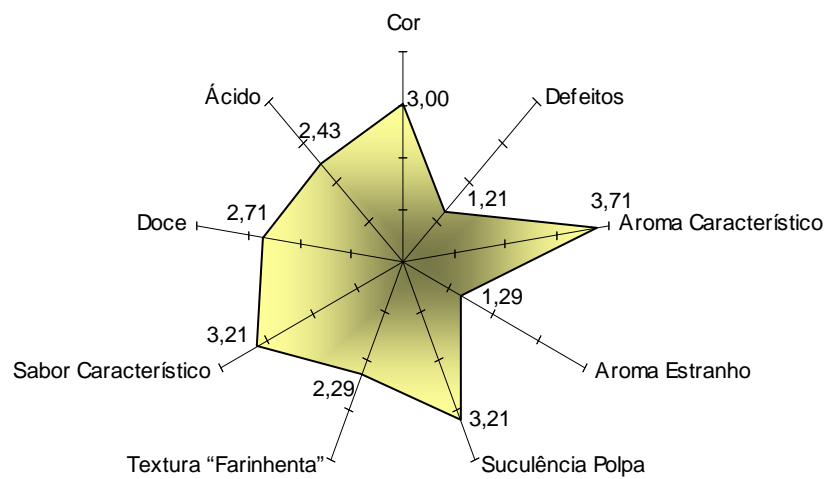
A suculência da polpa está directamente relacionada com o teor de água do tomate. Como seria de esperar, e atendendo aos resultados da humidade, o tomate português recebeu notas mais elevadas que o tomate espanhol, 3,57 e 3,21 respectivamente. Em termos da sensação “farinhenta” que o tomate provoca na boca, a diferença entre as amostras foi significativa ( $p \leq 0,05$ ). O painel de provadores atribuiu um valor médio de 1,79 ao tomate português e 2,29 ao tomate espanhol. Este parâmetro é inversamente proporcional à suculência da polpa.

O sabor característico, doce e ácido foram também avaliados pelos provadores. As notas atribuídas a estes três parâmetros, que definem o sabor do tomate, podem ser suportadas com base nas análises físico-químicas realizadas. O sabor característico detectado pelo painel foi bastante próximo para ambas as amostras, com ligeiro ascendente do tomate espanhol, que obteve uma média de 3,21 contra os 3,14 do tomate português. No que diz respeito ao sabor doce, ao contrário do que seria de esperar pela análise do teor de sólidos solúveis, o tomate espanhol registou notas mais elevadas que o tomate português, com valores médios de 2,71 e 2,36 respectivamente. Recorde-se que a análise do teor de sólidos solúveis atribuiu um valor de 4,11 e 3,83°Brix ao tomate português e espanhol respectivamente. Quanto ao sabor ácido o tomate de origem nacional registou valores mais elevados (2,64) que o espanhol (2,43), confirmando assim a maior acidez titulável total observada na análise química.

Os resultados mostram que o tomate de origem nacional possui teores elevados de licopeno. Atendendo à localização deste carotenóide no fruto e às quantidades de subprodutos da indústria de concentrado de tomate, confirma-se assim o interesse em estudar a extracção deste carotenóide a partir de subproduto com elevados teores de pericarpo.



**Fig. 6.11: Perfil sensorial do tomate de origem portuguesa**



**Fig. 6.12: Perfil sensorial do tomate de origem espanhola**

## 6.2. Extracção de Licopeno por CO<sub>2</sub> Supercrítico

Esta fase do trabalho experimental tem como objectivo específico a extracção de licopeno por CO<sub>2</sub> supercrítico a partir do repiso de tomate, de forma a valorizar este subproduto da indústria de concentrado de tomate. Para tal realizaram-se várias extracções nas instalações supercríticas do Instituto Superior Técnico.

### 6.2.1. Condições de Extracção

Com o objectivo de estudar o efeito da temperatura e da adição de co-solventes na extracção supercrítica dos carotenóides do repiso de tomate, o delineamento experimental assentou numa matriz factorial composta em que as variáveis independentes estudadas foram a temperatura e a concentração de etanol e de azeite. No **Quadro 6.1** estão expressos os limites superior e inferior entre os quais se fizeram variar os referidos parâmetros. No **Quadro 6.2** está representada a matriz codificada e decodificada utilizada para as três variáveis independentes, considerando um ponto central e oito pontos que definem a região de interesse. Parâmetros de extracção como a pressão, o tempo de extracção, o tamanho das partículas, a massa de repiso inicial e o caudal de CO<sub>2</sub> foram mantidos constantes (**Quadro 6.3**).

**Quadro 6.1: Limites de variação das variáveis independentes**

Limite	Temperatura (°C)	[Etanol] (%)	[Azeite] (%)
Mínimo	40	0	0
Máximo	75	10	10

**Quadro 6.2: Matriz do delineamento experimental**

Codificada			Decodificada		
x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	Temperatura (°C)	[Etanol] (%)	[Azeite] (%)
1	1	-1	75	10	0
0	0	0	57,5	5	5
-1	1	1	40	10	10
1	1	1	75	10	10
-1	-1	-1	40	0	0
-1	1	-1	40	10	0
1	-1	1	75	0	10
1	-1	-1	75	0	0
-1	-1	1	40	0	10

**Quadro 6.3: Parâmetros de extracção constantes**

Repiso (g)	Granulometria (mm)	Pressão (MPa)	Tempo (min)
25	0,5<x<1	20	90

### 6.2.2. Preparação da Amostra

Como foi referido no ponto 5.2.4., antes de se realizar uma extracção supercrítica é necessário proceder à secagem e redução do tamanho das partículas da amostra a fim de aumentar o rendimento de extracção. O repiso utilizado neste estudo foi cedido por uma das maiores fábricas de concentrado de tomate nacional, a “Fomento da Indústria do Tomate” (FIT). O repiso, referente à campanha de 2007, foi congelado imediatamente após produção em sacos de 1 kg, e mantido a -20°C até ao momento da utilização. A preparação da amostra englobou as seguintes operações: liofilização, trituração, crivagem e embalagem.

**Liofilização** – A secagem do material foi feita através de uma liofilização, na qual o repiso passou de uma humidade inicial de 75% para uma humidade de 4%. O repiso foi disposto num tabuleiro e em seguida colocado na câmara de congelação do liofilizador (**Fig. 6.13**) durante aproximadamente 24 horas, onde foi submetido a temperaturas da ordem dos -40°C, de forma a congelar toda a água disponível. Após congelação colocou-se o tabuleiro na câmara de vácuo do liofilizador. O repiso permaneceu durante aproximadamente 24 horas dentro da referida câmara de modo a sublimar toda a água congelada no passo anterior.



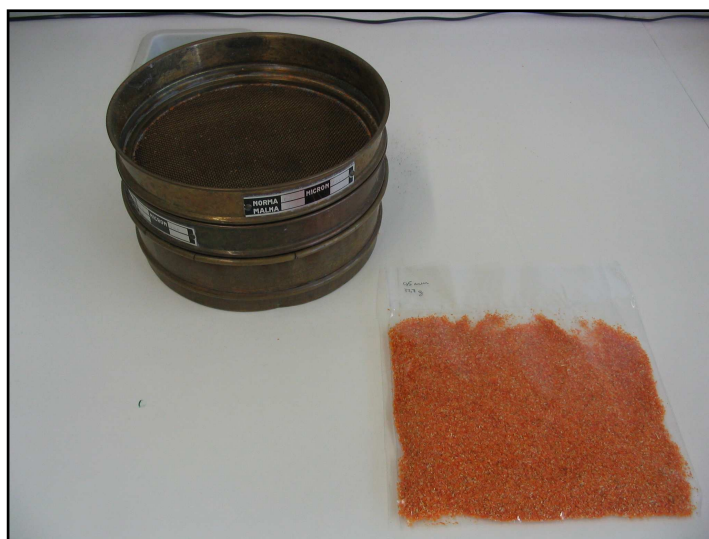
**Fig. 6.13: Câmara de congelação do liofilizador**



**Trituração** – A redução do tamanho das partículas de repiso efectuou-se mediante uma trituração em moinho de facas.

**Crivagem** – No sentido de caracterizar e uniformizar o tamanho das partículas a introduzir no extractor, as amostras trituradas foram em seguida submetidas a uma operação de crivagem. Para tal utilizou-se um jogo de crivos dispostos na vertical. Seleccionou-se para posterior extracção a fracção de tamanhos compreendidos entre 0,5 e 1mm.

**Embalagem** – Preparou-se uma amostra composta que em seguida foi dividida em 10 amostras (25g) e embalada em sacos que constituem uma barreira ao vapor de água, impedindo assim a re-hidratação da amostra. As amostras foram mantidas no escuro até ao momento da extracção. Na **Fig. 6.14** apresenta-se o jogo de crivos utilizado e o repiso embalado pronto para a extracção.

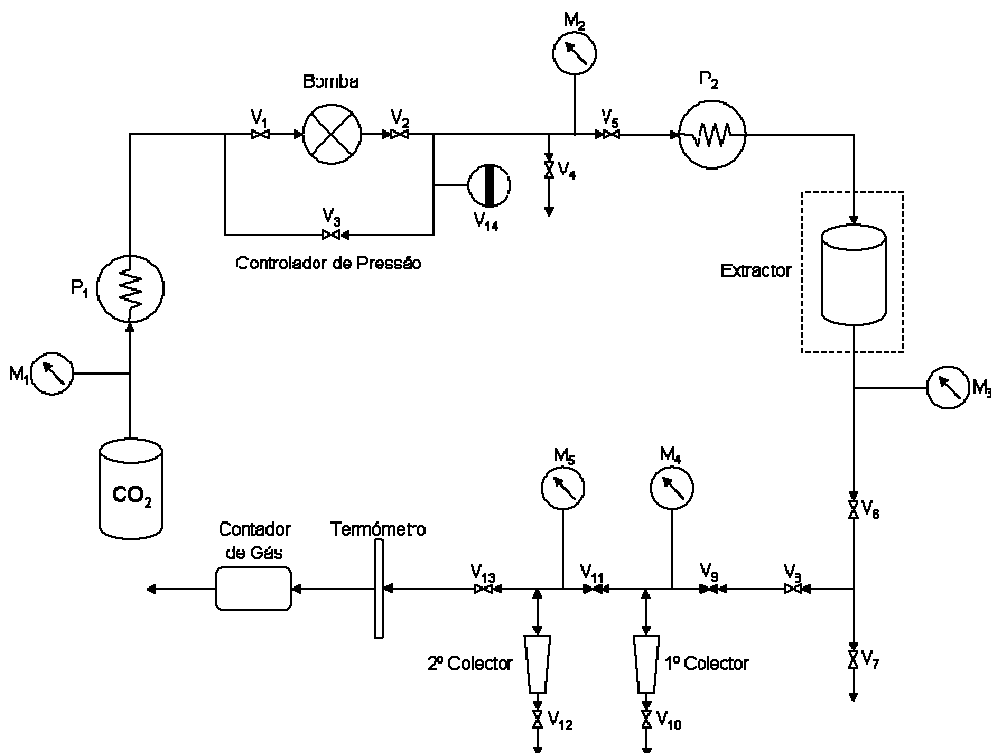


**Fig. 6.14: Jogo de crivos e repiso embalado**

### 6.2.3. Descrição das Instalações

Na **Fig. 6.15** apresenta-se um diagrama simplificado da instalação utilizada. O equipamento consiste basicamente nos seguintes componentes:

- Depósito de CO<sub>2</sub>;
- Permutador de calor (P<sub>1</sub>) para refrigeração do CO<sub>2</sub>;
- Bomba de pistão para pressurização do solvente;
- Permutador de calor (P<sub>2</sub>) para aquecimento do extrator;
- Extrator de 0,5 dm<sup>3</sup>;
- Zona de recolha.



**Fig. 6.15: Diagrama da instalação supercrítica**

**Depósito de CO<sub>2</sub>** – O CO<sub>2</sub> utilizado nas extracções foi fornecido em garrafas com prolongador, a fim de assegurar a saída do solvente no estado líquido, permitindo assim o bom funcionamento da bomba. A pressão do CO<sub>2</sub> à saída da garrafa é de aproximadamente 5MPa (M<sub>1</sub>) e a sua pureza de 99,95%.

**Permutador de calor ( $P_1$ )** – Após sair da garrafa o  $\text{CO}_2$  passa por um permutador de calor tubular para refrigeração até temperaturas próximas de  $0^\circ\text{C}$ , de forma a garantir que todo o  $\text{CO}_2$  se encontra no estado líquido à entrada da bomba. Para assegurar temperaturas desta ordem, colocou-se também gelo fundente sobre a cabeça da bomba.

**Bomba de pistão “Air Driven”** – Utilizou-se uma bomba Haskel, modelo MCPV-71, que atinge pressões até 69Mpa (**Fig. 6.16**). A bomba funciona utilizando um pistão accionado a ar comprimido. Este pistão está em contacto com uma pequena câmara por onde passa o líquido que é comprimido. O compressor utilizado para o fornecimento de ar à bomba é um Atlas Copco LXS 111. O  $\text{CO}_2$  é pressurizado desde a pressão da garrafa até à pressão de trabalho.



**Fig. 6.16: Bomba de pistão “Air Driven”**

**Permutador de calor ( $P_2$ )** – Tem a finalidade de aquecer o solvente e o extractor com a matriz vegetal inclusa até à temperatura de trabalho. A água é aquecida num banho e posteriormente bombeada para uma serpentina de aproximadamente 3m de tubo condutor que envolve o extractor.

**Extractor de  $0,5 \text{ dm}^3$**  – O extractor é formado pelo corpo do extractor e por uma tampa circular, onde encaixam 8 parafusos situados geometricamente em toda a volta. O corpo do extractor tem um diâmetro de 120mm, uma espessura de 35mm e uma altura de 403mm. Na **Fig. 6.17** pode-se observar o corpo do extractor sem a tampa colocada. Entre a tampa e o corpo do extractor colocou-se um anel de borracha a fim de garantir a estanquicidade do sistema. Uma vez que o extractor se encontra fixo o repiso liofilizado é

colocado primeiramente num cilindro com 27mm de comprimento, 45mm de diâmetro interno e 2,1mm de espessura. A base do cilindro é fechada com uma rede metálica e o topo com uma tampa de aço inox. O cilindro contendo o repiso é então colocado dentro do corpo do extractor e a tampa é apertada com a ajuda de uma chave-inglesa (**Fig. 6.18**). O CO<sub>2</sub> supercrítico entra no extractor pela sua base, atravessa a matriz sólida contida no cilindro e sai pelo topo contendo uma determinada quantidade de soluto dissolvido. A temperatura do extractor é controlada por dois termopares, um inserido à entrada do extractor e outro à saída.



**Fig. 6.17: Corpo do extractor sem tampa**



**Fig. 6.18: Extractor com tampa apertada**

**Zona de recolha** – A zona de recolha é constituída por dois colectores, três válvulas de expansão ( $V_8$ ,  $V_9$  e  $V_{11}$ ) e um banho de água com cabeça de aquecimento (**Fig. 6.19**). As válvulas  $V_9$  e  $V_{11}$  são válvulas de agulha em aço inox modelo 2215G4Y da Hoke, e controlam a pressão no primeiro e segundo colector respectivamente. Ambos os colectores são idênticos, constituídos por um tubo de aço inox em espiral, formando um cone invertido. A lavagem de cada colector é efectuada por dois orifícios, um à entrada e outro à saída, tapados por dois parafusos. Na extremidade do cone invertido encontra-se uma válvula de escape por onde se recolhe o soluto arrastado ( $V_{10}$  e  $V_{12}$ ). Com a redução da pressão e da temperatura na zona de recolha, o  $\text{CO}_2$  expande-se e perde poder solvente, permitindo a recolha dos solutos. Dado que a expansão é uma reacção endotérmica que leva a um arrefecimento brusco do fluido, as válvulas de expansão necessitam ser aquecidas, a fim de evitar a deposição de partículas sólidas de  $\text{CO}_2$  que poderiam provocar a obstrução da instalação. Esse aquecimento é assegurado por um banho de água quente onde as válvulas estão imersas. À saída do segundo colector encontra-se a última válvula de expansão ( $V_{13}$ ), a partir da qual o  $\text{CO}_2$  passa ao estado gasoso e encontra-se à pressão atmosférica. Os componentes da instalação, a partir desta última válvula, encontram-se dentro de uma caixa de acrílico por razões de segurança. São eles um caudalímetro, para medição do caudal de  $\text{CO}_2$  durante a extracção, um termómetro, para medição da temperatura de saída do  $\text{CO}_2$  e um contador de gás, para medição das quantidades de  $\text{CO}_2$  gasto em cada extracção. Em seguida o  $\text{CO}_2$  é lançado para a atmosfera.



**Fig. 6.19: Zona de recolha de solutos**



#### 6.2.4. Preparação da Instalação

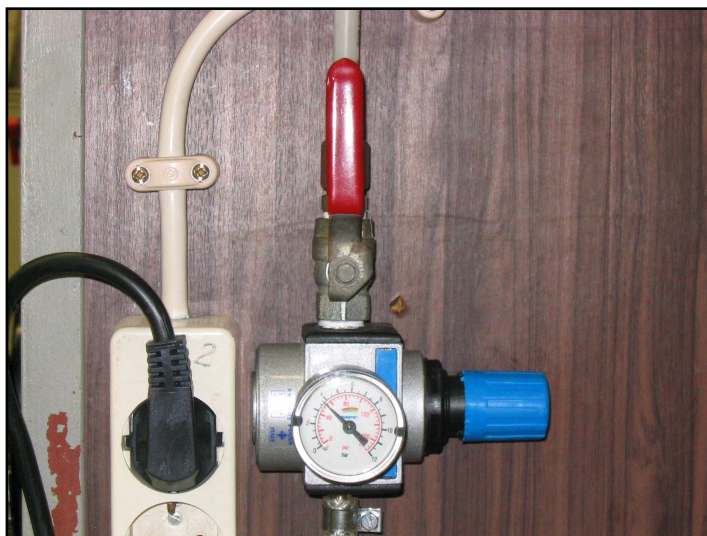
Antes de iniciar cada ensaio procedeu-se à limpeza da instalação e verificação de fugas. As tubagens desde a saída do extractor até à zona de recolha foram lavadas com acetona. Este solvente foi deixado em contacto com as paredes das tubagens durante 10 minutos e depois retirado por sucção através da ligação à rede de vácuo. Depois de efectuada esta lavagem seguiu-se uma extracção em branco, ou seja com o extractor vazio. Fez-se passar CO<sub>2</sub> a alta pressão por toda a instalação durante 2 horas com a finalidade de remover quaisquer resíduos presentes no interior do equipamento.

#### 6.2.5. Preparação do Ensaio

Amostras de 25g foram introduzidas no cilindro do extractor. Na base e no topo do extractor introduziu-se também malha de aço e um disco de algodão com 3mm de espessura. A malha de aço tem a finalidade de evitar o arrastamento de partículas para as tubagens, enquanto que o algodão serve de suporte para o co-solvente nas extracções em que se utiliza azeite e/ou etanol. O co-solvente foi colocado o mais uniformemente possível no disco de algodão que foi colocado na base do cilindro, de modo a que o CO<sub>2</sub> ao entrar no extractor arraste o co-solvente para a matriz vegetal.

Seguidamente colocou-se o cilindro, já com a matriz vegetal inclusa, dentro do corpo do extractor e apertou-se bem a tampa de aço. Antes de se iniciar a pressurização do sistema, certificou-se que o banho frio (P<sub>1</sub>) e o banho quente (P<sub>2</sub>) se encontravam à temperatura desejada. A temperatura ideal para P<sub>1</sub> é de 0°C, enquanto que a de P<sub>2</sub> pode variar entre os 40°C e os 75°C consoante a extracção a efectuar. Em qualquer dos casos os banhos foram ligados cerca de 2 horas antes do início previsto da extracção.

A pressurização do sistema iniciou-se pela abertura suave da garrafa de CO<sub>2</sub>, fazendo com que este passe até ao extractor, elevando a pressão do sistema até à pressão da garrafa, ou seja 5MPa. Atingida esta pressão, abriu-se lentamente a válvula de ar comprimido V<sub>3</sub> (**Fig. 6.20**) accionando a bomba de pistão, o que elevou a pressão até aos valores desejados, ou seja, 20MPa (M<sub>2</sub> e M<sub>3</sub>).



**Fig. 6.20: Válvula de ar comprimido**

### **6.2.6. Procedimento de Extracção**

O objectivo de cada ensaio é determinar o rendimento de extracção para as diversas condições de temperatura e tipo de co-solvente utilizado. Depois da instalação se encontrar à pressão e temperatura de trabalho, abriram-se lentamente as válvulas de descompressão ( $V_8$ ,  $V_9$ ,  $V_{11}$  e  $V_{13}$ ) e regularam-se de modo a atingir as condições de recolha previamente estabelecidas. Estas condições de pressão e temperatura, apresentadas no **Quadro 6.4**, foram escolhidas em função da natureza dos compostos a extractar e com base na bibliografia. Em condições normais consegue-se a estabilização de condições de pressão ( $M_4$  e  $M_5$ ) e caudal ao fim de alguns minutos. A partir deste momento contaram-se os 90 minutos de extracção. Um factor tido em conta durante todos os ensaios foi manter o rotâmetro sempre nos 80% estabelecidos, assegurando assim um igual volume de  $\text{CO}_2$  gasto no final de cada extracção. No final do tempo estabelecido fechou-se a válvula  $V_8$ , mantendo as válvulas  $V_9$ ,  $V_{11}$  e  $V_{13}$  abertas até escoamento total do  $\text{CO}_2$ . A garrafa de  $\text{CO}_2$  e a válvula de ar comprimido também foram fechadas. Quando os manómetros  $M_4$  e  $M_5$  indicam a pressão atmosférica e o rotâmetro se encontra nos 0% é sinal que todo o  $\text{CO}_2$  foi libertado e neste momento registou-se o valor da leitura do contador de gás. O processo de escoamento do  $\text{CO}_2$  da zona de recolha demora aproximadamente 10 minutos, tempo após o qual se iniciou a recolha dos extractos dos colectores.

**Quadro 6.4: Condições de recolha dos extractos**

Condições 1º Colector		Condições 2º Colector	
Temperatura (°C)	Pressão (MPa)	Temperatura (°C)	Pressão (MPa)
35	8	15	1

### 6.2.7. Procedimento de Recolha

A recolha dos extractos foi realizada através de lavagens sucessivas com etanol, de modo a arrastar os solutos que precipitam em cada um dos colectores. Este arrastamento seria mais rápido e eficiente com o recurso a acetona, mas este solvente inviabilizaria o uso futuro dos extractos em produtos alimentares, pelo que se optou pelo etanol. Para iniciar a recolha dos extractos removeram-se os quatro parafusos, dois em cada colector, que cobrem os orifícios por onde se introduzirá o etanol. Seguidamente encheu-se cada colector com etanol e deixou-se repousar durante 10 minutos. Ao fim deste tempo abriram-se as válvulas  $V_{10}$  e  $V_{12}$ . O etanol contido em cada colector cai por gravidade para duas pêras de vidro, cada uma correspondente a um colector, arrastando consigo os carotenóides extraídos. As pêras de vidro foram previamente identificadas, pesadas e cobertas com folha de papel de alumínio de modo a proteger os extractos da luz. O processo de lavagens repetiu-se até o etanol se encontrar incolor à saída dos colectores. As pêras contendo o etanol e os carotenóides por si arrastados foram guardadas no congelador para posterior evaporação. Seguiu-se então a descarga total do sistema, pois devido ao facto de a válvula  $V_6$  continuar fechada, o extractor continuou à pressão de trabalho de 20Mpa. As válvulas de recolha de extracto ( $V_{10}$  e  $V_{12}$ ) foram fechadas, bem como as válvulas de expansão  $V_8$ ,  $V_9$ ,  $V_{11}$  e  $V_{13}$ . Iniciou-se a despressurização total do sistema abrindo lentamente a válvulas  $V_6$  e restabelecendo os equilíbrios nas válvulas  $V_8$ ,  $V_9$ ,  $V_{11}$  e  $V_{13}$ . Como a garrafa de  $CO_2$  e a válvula de ar comprimido se encontram fechadas, o sistema começa a perder pressão, até que ao fim de 30 minutos se atinge a pressão atmosférica. O extractor foi aberto e a matriz vegetal retirada. Procedeu-se à lavagem das tubagens e do cilindro de aço com acetona e o processo reiniciou-se de modo a realizar outra extracção.



### 6.2.8. Preparação dos Extractos

Os carotenóides extraídos encontram-se em solução com o etanol utilizado na lavagem dos colectores. O passo que se seguiu foi a evaporação à secura dos extractos. As pêras de vidro correspondentes a cada um dos colectores foram evaporadas sob vácuo, em evaporador rotativo Heidolf VV2000, com banho de água quente Heidolf WB2000, como se apresenta na **Fig. 6.21**. A temperatura do banho foi mantida a 25°C para não degradar os carotenóides do extracto. O etanol evaporado nesta operação foi reutilizado na lavagem dos colectores para outros pontos da matriz experimental. Após evaporação total do etanol, as pêras de vidro foram novamente pesadas. A diferença entre a massa das pêras mais o extracto e a massa das pêras inicial dá-nos a massa de extracto obtida em cada colector, e permite fazer os cálculos do rendimento total de extracção, tendo em conta a massa de repiso que entrou no extractor. Para calcular o rendimento de extracção de cada constituinte do extracto, nomeadamente licopeno, foi necessário realizar uma análise por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).



**Fig. 6.21: Evaporador rotativo**

### 6.2.9. Análise dos Extractos por HPLC

Os extractos obtidos foram redissolvidos numa solução de diclorometano/acetonitrilo 1:1 (v/v) e pipetou-se uma determinada quantidade para um frasco de 5mL. Os frascos foram selados com uma tampa de borracha envolta em parafilme de modo a evitar fugas durante o transporte. Como se pode ver na **Fig. 6.22** os extractos apresentam uma cor avermelhada, característica do licopeno. Em cada frasco escreveram-se as condições de extracção, temperatura, concentração de etanol e concentração de azeite, bem como a data de extracção e o colector de onde o extracto foi retirado. Os frascos foram então transportados em gelo seco e ao abrigo da luz, para o Instituto Superior de Agronomia, onde se realizou a análise por HPLC. Os extractos foram previamente filtrados em filtro de membrana de 0,45µm. Seguiu-se a injeção de 20µL de extracto filtrado numa coluna com fase móvel constituída por diclorometano e acetonitrilo. Foram efectuadas corridas de uma hora para cada extracto e no fim comparados os resultados com cromatogramas de substâncias padrão que se pretendiam estudar. As leituras para o licopeno foram efectuadas a 475nm, enquanto que para os restantes carotenóides utilizou-se um comprimento de onda de 440nm. Os outros carotenóides estudados foram a neoxantina, a violoxantina, a anteraxantina, a luteína e a zeaxantina, para além dos já conhecidos  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -caroteno.



**Fig. 6.22: Extractos para HPLC**

### 6.2.10. Resultados e Discussão

Os valores experimentais (**Anexo V**) foram tratados segundo a metodologia RSM (Método de Superfície de Resposta) no programa Statistica 6.1. Este programa vai ajustar os pontos experimentais a uma superfície, traduzida numa equação onde a variável dependente é função de variáveis independentes, acrescidas de um erro. Assumiu-se que para valores de  $p > 5\%$  o modelo não é significativo, para valores de  $p < 1\%$  (\*\*) o modelo é altamente significativo, sendo significativo para  $1\% < p < 5\%$  (\*).

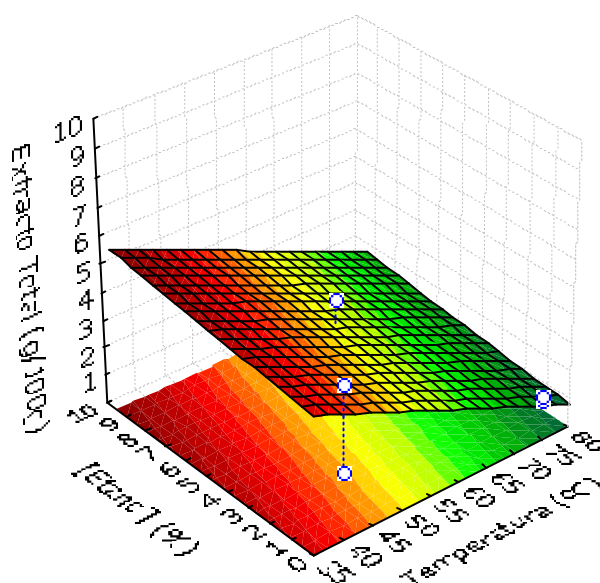
A partir das diversas equações polinomiais das variáveis dependentes, elaboraram-se os gráficos de superfície de resposta de modo a relacionar cada duas variáveis independentes entre si, mantendo a terceira constante no valor correspondente ao seu ponto central (57,5°C de temperatura, 5% de etanol e 5% de azeite).

A equação **6.2** traduz o rendimento total de extração (RT) em função das três variáveis independentes estudadas: temperatura (T), concentração de etanol (E) e concentração de azeite (A).

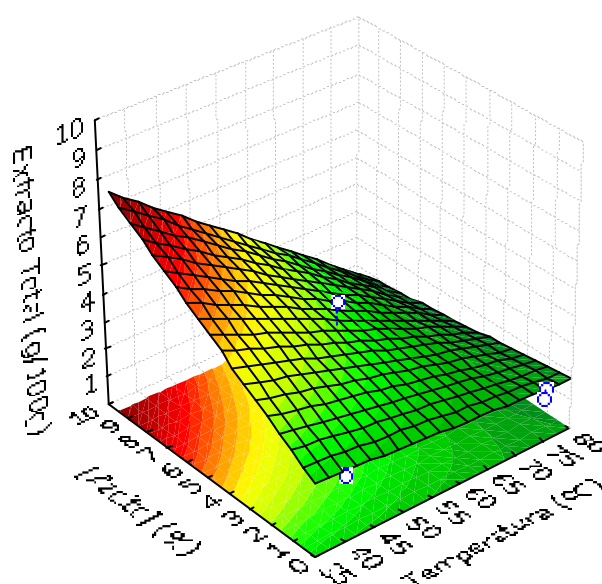
$$RT = 2,792867 - 0,018551T + 0,092879E + 1,056433A - 0,014503TA^*$$

(Eq. 6.2)

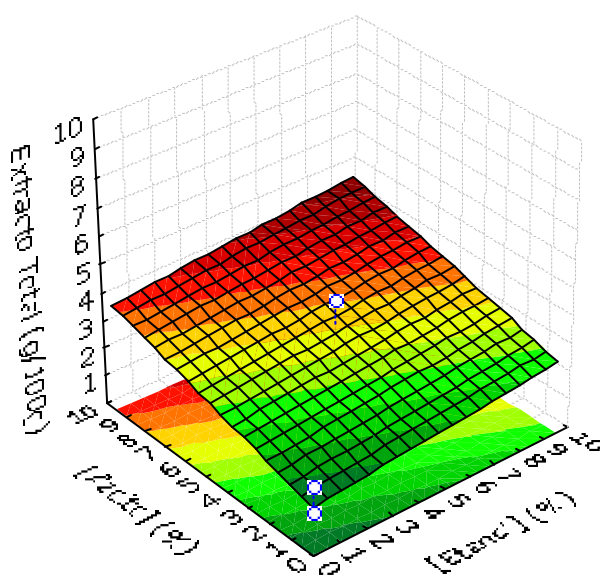
$R^2$ : 0,90 Adj.: 0,80



**Fig. 6.23: Superfície de resposta para o extracto total em função das variáveis independentes concentração de etanol e temperatura**



**Fig. 6.24: Superfície de resposta para o extracto total em função das variáveis independentes concentração de azeite e temperatura**



**Fig. 6.25: Superfície de resposta para o extracto total em função das variáveis independentes concentração de azeite e concentração de etanol**

Com base na equação 6.2 e analisando as Fig. 6.23, 6.24 e 6.25 é possível afirmar que a temperatura afecta negativamente de uma forma linear o rendimento total de extracção. A variável independente concentração de azeite tem uma influência positiva significativa na concentração de extracto obtido, enquanto que a concentração de etanol não afecta esta variável. Uma explicação para a elevada concentração de extracto obtido nos ensaios com azeite é o facto de este poder ser recolhido juntamente com os pigmentos extraídos, aumentando assim a massa do extracto final.

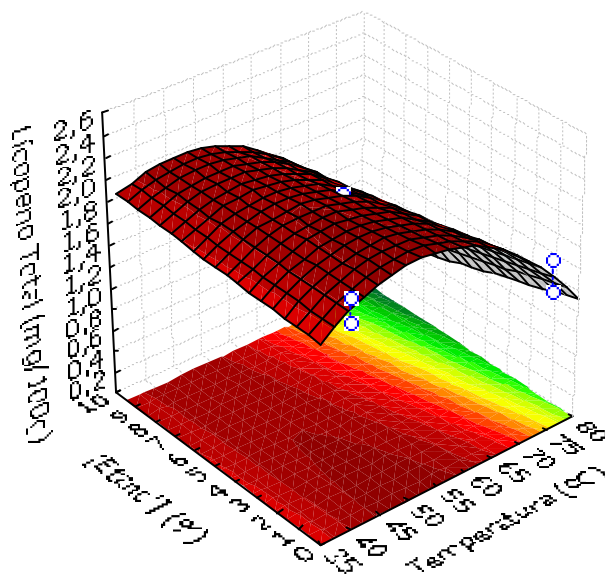
A equação **6.3** traduz o rendimento de extracção de licopeno (L) em função das três variáveis independentes estudadas: temperatura (T), concentração de etanol (E) e concentração de azeite (A). Nas **Fig. 6.26, 6.27 e 6.28** apresentam-se as respectivas superfícies de resposta. Neste caso verifica-se que a temperatura afecta positivamente a variável dependente de uma forma linear e negativamente de uma forma quadrática. A análise das **Fig. 6.26 e 6.27** evidencia uma temperatura óptima de extracção de licopeno próximo dos 50°C, onde se obteve um valor de 2,181mg/100g. É possível concluir também que o efeito da concentração dos co-solventes etanol e azeite não tem muita influência no rendimento de extracção do licopeno, embora a adição de etanol se demonstre mais eficaz que a adição de azeite para a extracção deste carotenóide.

Atendendo ao teor total de licopeno presente na amostra de repiso, 38,42mg/100g, verifica-se que o rendimento da extracção por CO<sub>2</sub> supercrítico, nas condições de trabalho, resultou muito baixo, de apenas 5,7%. O principal factor que explica este fraco rendimento é, sem dúvida, a baixa pressão de trabalho (20MPa), a que o equipamento estava limitado por questões de segurança.

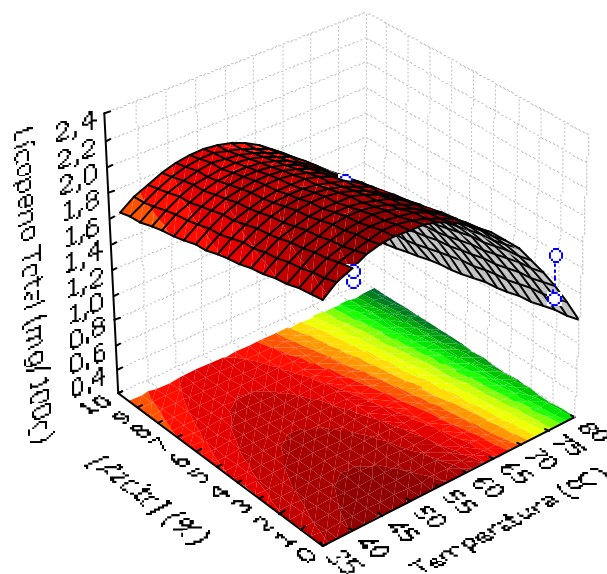
$$L = -1,02989 + 0,13188T - 0,00128T^2 + 0,07253E - 0,03932A - 0,00173TE$$

(Eq. 6.3)

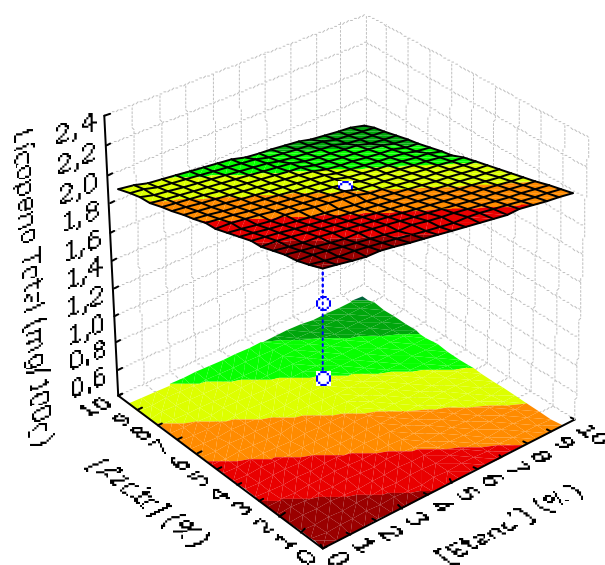
R<sup>2</sup>: 0,96 Adj.: 0,89



**Fig. 6.26: Superfície de resposta para o licopeno total em função das variáveis independentes concentração de etanol e temperatura**



**Fig. 6.27: Superfície de resposta para o licopeno total em função das variáveis independentes concentração de azeite e temperatura**



**Fig. 6.28: Superfície de resposta para o licopeno total em função das variáveis independentes concentração de azeite e concentração de etanol**

A equação 6.4 traduz o rendimento de extração para o  $\alpha$ -caroteno ( $\alpha$ ) em função das três variáveis independentes estudadas: temperatura (T), concentração de etanol (E) e concentração de azeite (A).

$$\alpha = 1,012723^{**} - 0,011422T^{**} + 0,007936E - 0,003164A - 0,002555EA$$

(Eq. 6.4)

$R^2$ : 0,90 Adj.: 0,80

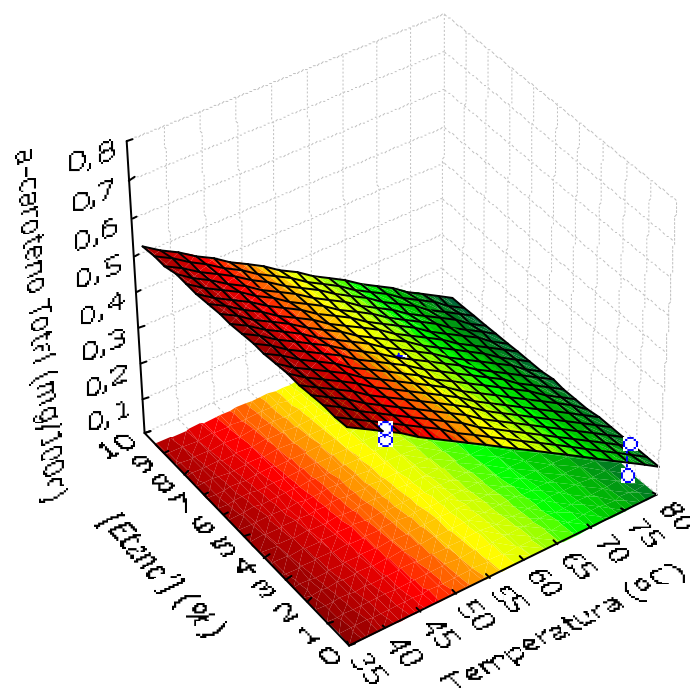


Fig. 6.29: Superfície de resposta para o  $\alpha$ -caroteno total em função das variáveis independentes concentração de etanol e temperatura

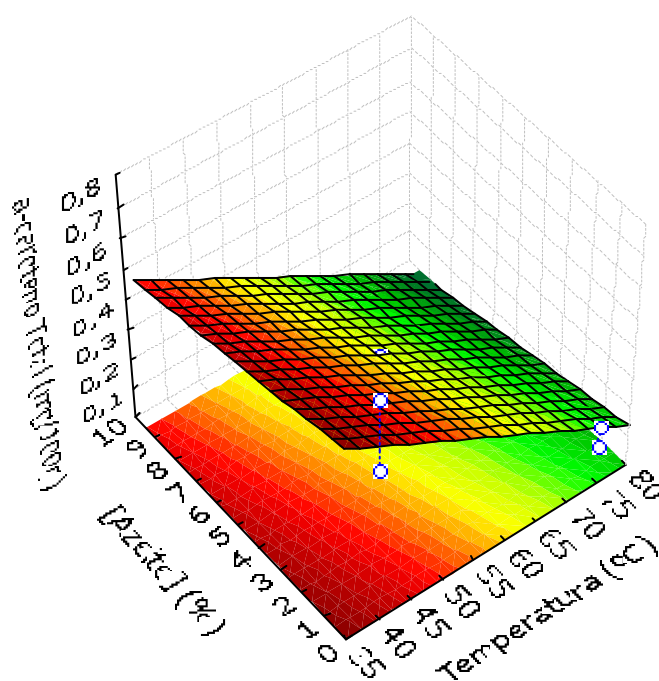
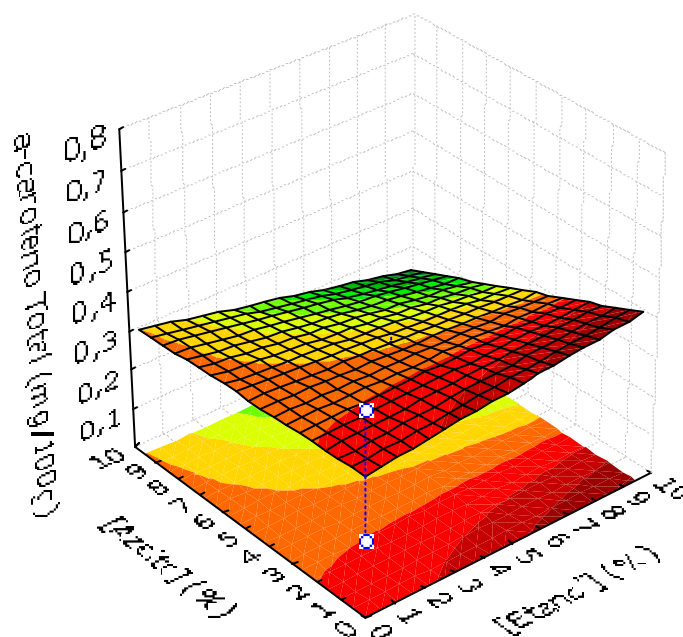


Fig. 6.30: Superfície de resposta para o  $\alpha$ -caroteno total em função das variáveis independentes concentração de azeite e temperatura





**Fig. 6.31: Superfície de resposta para o  $\alpha$ -caroteno total em função das variáveis independentes concentração de azeite e concentração de etanol**

As superfícies representadas nas **Fig. 6.29, 6.30 e 6.31** confirmam que a temperatura tem um efeito negativo muito significativo ( $p < 0,01$ ) no rendimento de extracção do  $\alpha$ -caroteno. A concentração de co-solventes não afecta significativamente a extracção de  $\alpha$ -caroteno, embora se observe que o etanol tem um ligeiro efeito positivo e o azeite um ligeiro efeito negativo na extracção deste carotenóide.

A equação **6.5** traduz o rendimento de extracção para o  $\beta$ -caroteno ( $\beta$ ) em função das três variáveis independentes estudadas: temperatura (T), concentração de etanol (E) e concentração de azeite (A). A partir da equação polinomial estabelecida verifica-se que a extracção de  $\beta$ -caroteno tem um comportamento idêntico à extracção de  $\alpha$ -caroteno, ou seja, a temperatura tem um efeito negativo significativo ( $0,01 < p < 0,05$ ), a concentração de etanol contribui positivamente na extracção, ainda que ligeiramente, e a concentração de azeite tem um efeito ligeiramente negativo. As superfícies de resposta correspondentes a esta variável dependente são apresentadas nas **Fig. 6.32, 6.33 e 6.34**

$$\beta = 0,197987^{**} - 0,001832T^{*} + 0,000006E - 0,000845A - 0,000505EA$$

(Eq. 6.5)

$R^2: 0,88$  Adj.:  $0,77$



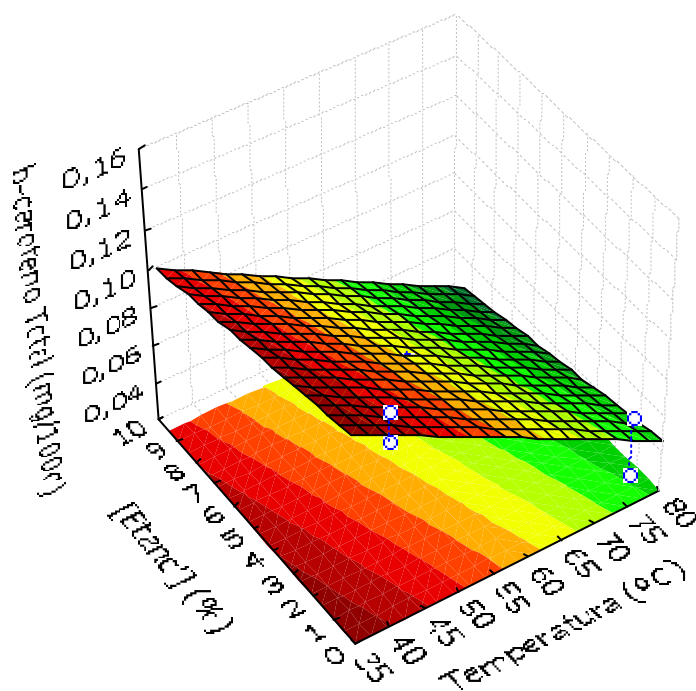


Fig. 6.32: Superfície de resposta para o  $\beta$ -caroteno total em função das variáveis independentes concentração de etanol e temperatura

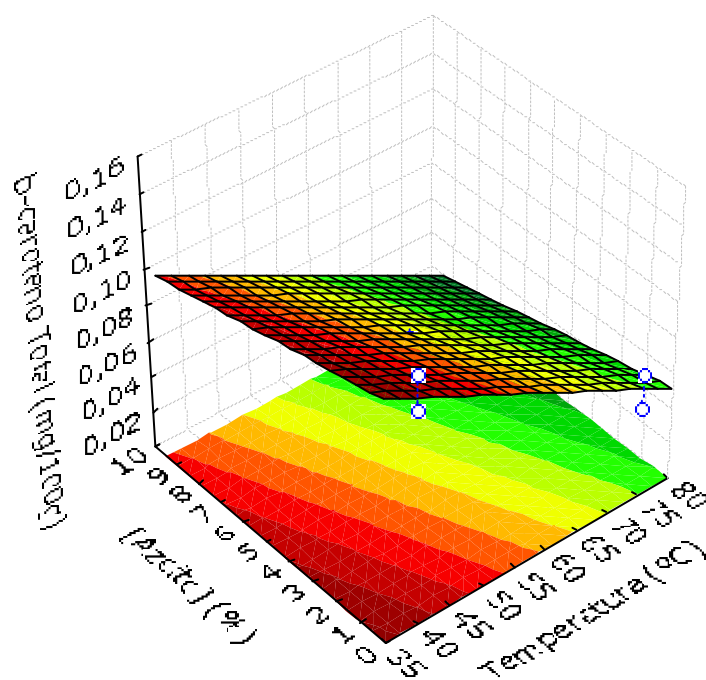
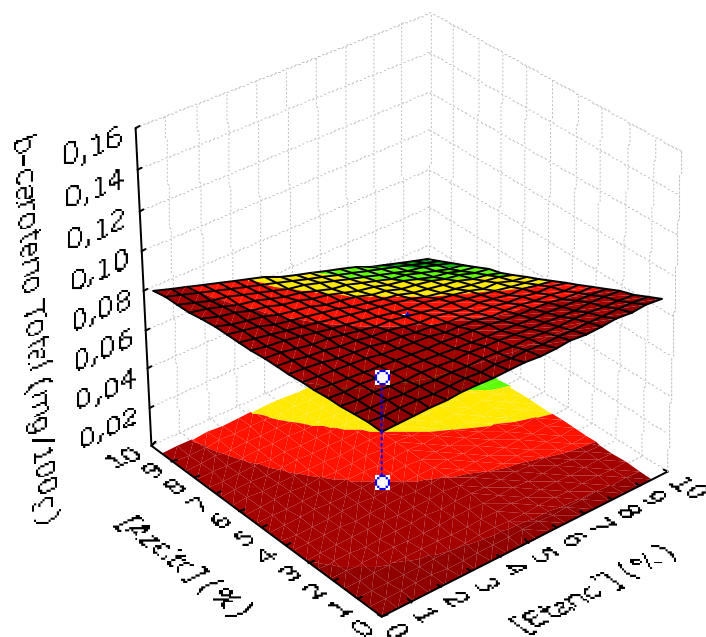


Fig. 6.33: Superfície de resposta para o  $\beta$ -caroteno total em função das variáveis independentes concentração de azeite e temperatura



**Fig. 6.34: Superfície de resposta para o  $\beta$ -caroteno total em função das variáveis independentes concentração de azeite e concentração de etanol**

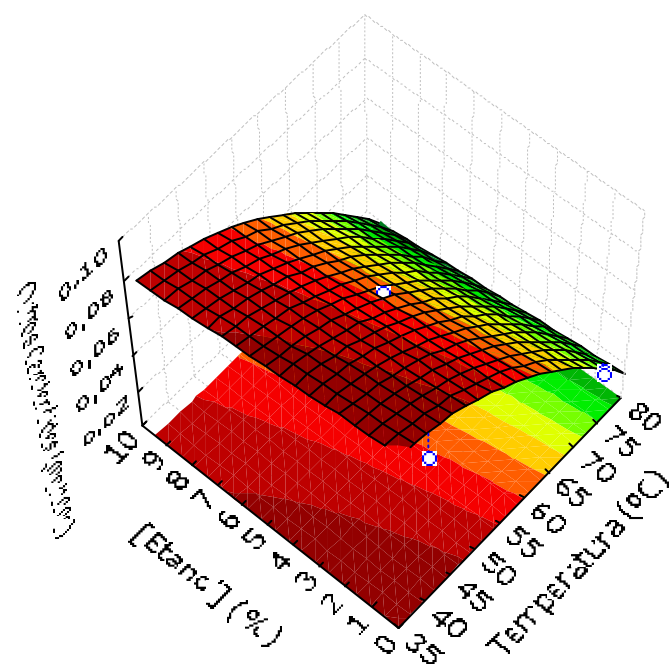
Os restantes carotenóides estudados foram a neoxantina, a violoxantina, a anteraxantina, a luteína e a zeaxantina. A equação **6.6** traduz o respectivo rendimento de extracção (OC) em função das três variáveis independentes estudadas: temperatura (T), concentração de etanol (E) e concentração de azeite (A).

$$\text{OC} = 0,078876 + 0,001942T - 0,000034T^2 - 0,001632E - 0,000979A$$

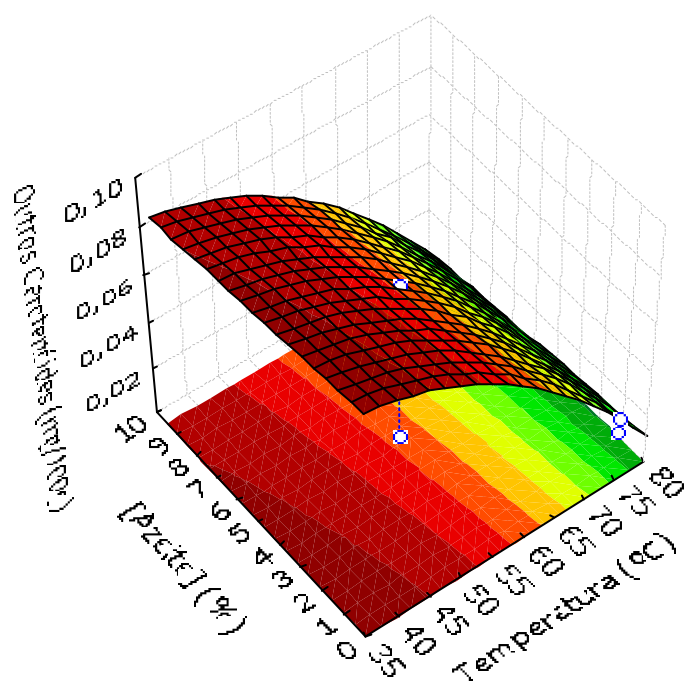
(Eq. 6.6)

$$R^2: 0,96 \text{ Adj.: } 0,92$$

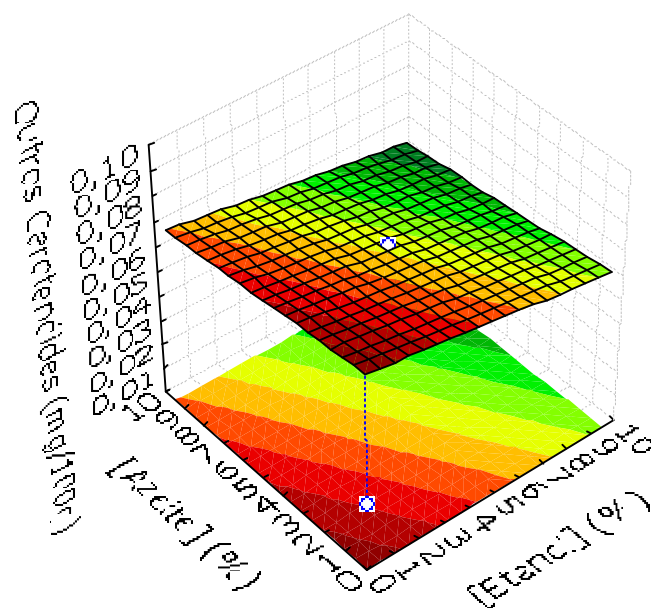
Nas **Fig. 6.35**, **6.36** e **6.37** apresentam-se as superfícies de resposta que descrevem o rendimento de extracção dos referidos carotenóides. Mais uma vez se verifica que a temperatura afecta negativamente a variável dependente, ou seja, quanto menor a temperatura de extracção, maior o rendimento de extracto obtido. A adição de co-solventes teve um ligeiro efeito negativo na extracção dos restantes carotenóides. Mais uma vez a pressão de trabalho poderá ter influenciado os resultados de extracção, a par de outros factores como o tempo de extracção e o tamanho das partículas.



**Fig. 6.35:** Superfície de resposta para os outros carotenóides em função das variáveis independentes concentração de etanol e temperatura



**Fig. 6.36:** Superfície de resposta para os outros carotenóides em função das variáveis independentes concentração de azeite e temperatura

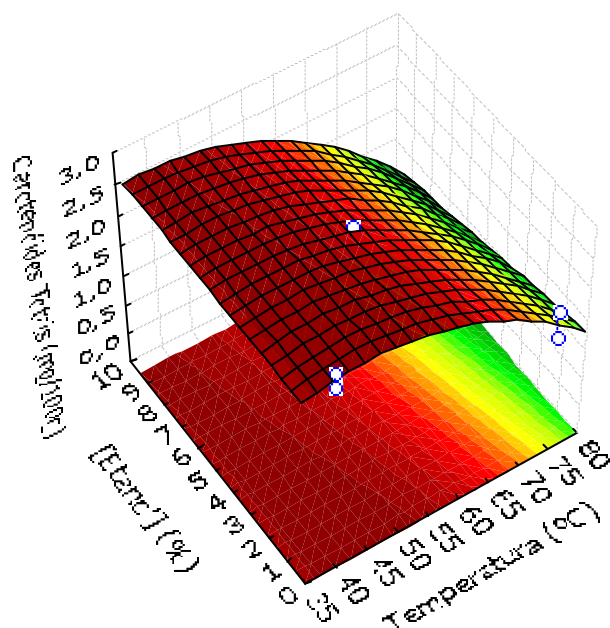


**Fig. 6.37: Superfície de resposta para os outros carotenóides em função das variáveis independentes concentração de azeite e concentração de etanol**

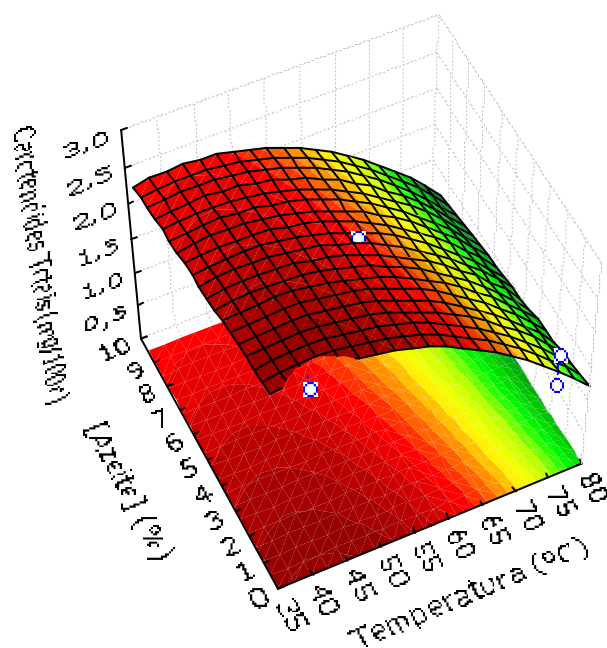
A equação 6.7 traduz o rendimento de extracção para os carotenóides totais (C) em função das três variáveis independentes estudadas: temperatura (T), concentração de etanol (E) e concentração de azeite (A).

$$C = 0,484477 + 0,109412T - 0,001217T^2 + 0,093244E - 0,031035A - 0,001794TE - 0,005716EA \text{ (Eq. 6.7)}$$

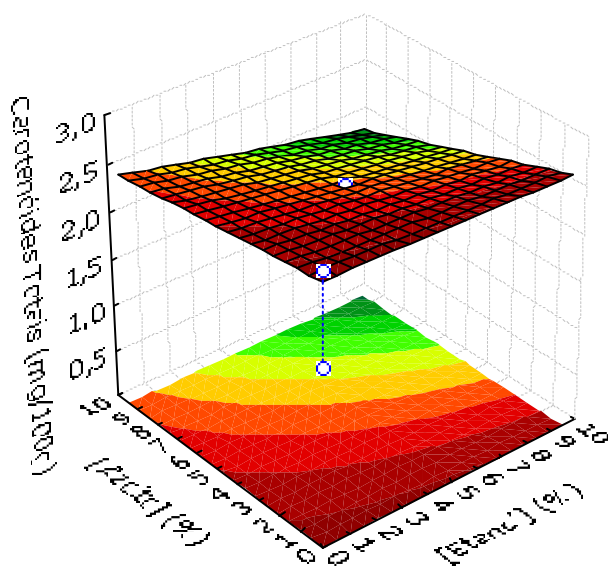
$R^2: 0,99$  Adj.: 0,99



**Fig. 6.38: Superfície de resposta para os carotenóides totais em função das variáveis independentes concentração de etanol e temperatura**



**Fig. 6.39: Superfície de resposta para os carotenóides totais em função das variáveis independentes concentração de azeite e temperatura**



**Fig. 6.40: Superfície de resposta para os carotenóides totais em função das variáveis independentes concentração de azeite e concentração de etanol**

No rendimento de extracção dos carotenóides totais observa-se mais uma vez que a temperatura promove um efeito linear positivo não significativo e um efeito quadrático negativo com  $p < 0,05$ . O elevado valor de  $R^2$  (0,99), bem como do R ajustado (0,99), demonstra o bom ajustamento do modelo no que respeita à determinação do teor de carotenóides totais. A adição de etanol à extracção resultou mais uma vez num ligeiro efeito positivo, enquanto que o azeite afectou a extracção negativamente. A interacção do etanol com a temperatura e com o azeite influenciou negativamente, de forma significativa ( $p < 0,05$ ), a variável dependente em estudo. A análise dos gráficos das **Fig. 6.38, 6.39 e 6.40** mostra a existência de uma temperatura óptima de extracção supercrítica dos carotenóides presentes no repiso de tomate, para as condições descritas, que se situa próximo dos 45°C. No **Quadro 6.5** apresenta-se uma síntese dos efeitos das variáveis independentes sobre as diversas variáveis dependentes estudadas.

**Quadro 6.5: Síntese dos efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes**

Variável	Temperatura	[Etanol]	[Azeite]
Extracto Total	Não significativo	Não significativo	Efeito positivo ( $p < 0,05$ )
Licopeno	Temperatura óptima 50°C	Não significativo	Não significativo
$\alpha$ -caroteno	Efeito negativo ( $1 < p < 0,05$ )	Não significativo	Não significativo
$\beta$ -caroteno	Efeito negativo ( $p < 0,05$ )	Não significativo	Não significativo
Outros Carotenóides	Não significativo	Não significativo	Não significativo
Carotenóides Totais	Temperatura óptima 45°C	Efeito positivo ( $p < 0,05$ )	Não significativo

A análise do **Quadro 6.5** permite concluir que a temperatura tem um efeito negativo significativo na extracção de  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno, verificando-se a existência de uma temperatura óptima de 50°C na extracção de licopeno e de 45°C na extracção de carotenóides totais. A utilização de etanol como co-solvente promove um ligeiro efeito positivo, mas não significativo, em todas as variáveis dependentes estudadas, o que justifica que o efeito na extracção de carotenóides totais seja significativamente positivo. O azeite adicionado como co-solvente aumenta significativamente o rendimento de extracção total sem no entanto afectar a extracção dos vários carotenóides, o que se explica pela elevada massa de azeite recolhida nos extractos.

## 7. Conclusões

Com base nos resultados da análise físico-químicas e sensorial conclui-se que o tomate nacional para indústria apresenta uma boa qualidade global, nomeadamente no que respeita ao elevado teor de licopeno, 41,56mg/100g (m/m base seca). Em todos os outros parâmetros de qualidade estudados, o tomate de origem portuguesa apresentou resultados médios compatíveis com frutos de boa qualidade.

Os elevados montantes de repiso de tomate produzidos anualmente e o elevado teor de licopeno que este contem, justificam a extracção/valorização deste carotenóide a partir deste subproduto. Tendo em mente o interesse do licopeno para a indústria alimentar e atendendo a que os extractos supercríticos são inócuos, equacionou-se este processo para a obtenção de licopeno a partir de repiso de tomate.

Entre as variáveis independentes estudadas, a temperatura revelou ter um efeito negativo significativo na extracção de  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno. Verificou-se a existência de uma temperatura óptima de 50°C para a extracção supercrítica de licopeno e de 45°C para a extracção de todos os carotenóides presentes no repiso de tomate.

A utilização de etanol como co-solvente promove um ligeiro efeito positivo, mas não significativo, em todas as variáveis dependentes estudadas. O azeite como co-solvente aumenta significativamente o rendimento de extracção total sem no entanto afectar a extracção dos vários carotenóides.

O rendimento de extracção supercrítica de licopeno a partir de repiso de tomate, principal composto alvo deste estudo, foi baixo, de apenas 5,7% do total. O total de licopeno presente neste subproduto é de 38,42mg/100g tendo-se conseguido extrair apenas 2,181mg/100g.

O trabalho efectuado, bem como diferentes referências bibliográficas, apontam para a viabilidade de utilizar o CO<sub>2</sub> supercrítico para a extracção de licopeno de repiso de tomate para utilização na indústria alimentar ou farmacêutica. Dadas as características do licopeno e a sua inclusão na matriz vegetal, torna-se necessário estudar eventuais pré-tratamentos do repiso com vista a facilitar a extracção e estudar pressões mais elevadas de extracção bem como tempos de extracção mais prolongados.

## 8. Referências Bibliográficas

- AGARWAL, S. e RAO, A. V. (1998) – Tomato Lycopene and Low Density Lipoprotein Oxidation: A Human Dietary Intervention Study. *Lipids*. **33**:981 – 984.
- ARTÉS, F.; SÁNCHEZ, E. e TIJSKENS, L. M. M. (1998) – Quality and Shelf Life of Tomatoes Improved by Intermittent Warming. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. **31**:427 – 431.
- BAYSAL, T.; ERSUS, S.; STARMANS, D. A. J. (2000) – Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of  $\beta$ -carotene and Lycopene from Tomato Paste Waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**: 5507 – 5511.
- BOILEAU, A. C.; MERCHEN, N. R.; WASSON, K.; ATKISSON, C. A. e ERDMAN, J. W. (1999) – Cis-lycopene is more Bioavailable than Trans-lycopene in vitro and in vivo in Lymphcannulated Ferrets. *Journal of Nutr.* **129**:1176 – 1181.
- BORGUINI, R. G. (2002) – *Tomate (Lycopersicon esculentum Mill.) Orgânico: O Conteúdo Nutricional e a Opinião do Consumidor*. Dissertação de Mestrado apresentada à Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracacicaba. pp. 110.
- BURTON, G. W. e INGOLD, K. U. (1984) –  $\beta$ -carotene: An Unusual Type of Lipid Antioxidant. *Science*. **224**:569 – 573.
- CAMPOS, W. E.; SATURINO, H. M.; BORGES, A. L. C. C.; REIS E SILVA, R.; SOUSA, B. M.; CAMPOS, M. M.; ROGÉRIO, M. C. P. (2007) – Digestibilidade Aparente de Dietas Contendo Diferentes Proporções de Resíduo Industrial de Tomate. *Ciência Animal Brasileira*. n.3, **8**:479 – 484.
- CHITARRA, M. I. F. (1994) – Colheita e Qualidade Pós-Colheita de Frutos. *Informe Agropecuário*. n.179, **17**:8 – 18.
- CHOKSI, P. M. e JOSHI, V. Y. (2007) – A Review on Lycopene - Extraction, Purification, Stability and Applications. *International Journal of Food Properties*. n.10, **2**:289 - 298
- CURL, A. L. (1961) – The Xanthophylls of Tomatoes. *Journal of Food and Science*. **26**:106 – 111.
- DEL VALLE, M.; CAMARA, M.; TORIJA, M. E. (2006) - Chemical Characterization of Tomato Pomace. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. n.8, **86**:1232 – 1236.
- EMENHISER, C.; SANDER, L. C. e SCHWARTZ, S. J. (1995) – Capability of a Polymeric C<sub>30</sub> Stationary Phase to Resolve Cis-Trans Carotenoids in Reversed Phase Liquid Chromatograph. *Journal of Chromatography*. **707**:205 – 216.
- ESQUÍVEL, M. M. L. T. (1994) – *Extração supercrítica de óleo de bagaço de azeitona*. Tese de Doutorado para Obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior Técnico. pp.: 195.



FACHIN, D. (2003) – *Temperature and Pressure Inactivation of Tomato Pectinases: a Kinetic Study*. Proefschrift (Doctoraats in de Toegepaste Biologische Wetenschappen Door). Katholieke Universiteit Leuven. pp. 133.

FERREIRA, S. M. R. (2004) – *Características de Qualidade do Tomate de Mesa (Lycopersicon esculentum Mill.) Cultivado nos Sistemas Convencional e Orgânico Comercializado na Região Metropolitana de Curitiba*. Tese de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná. Curitiba. pp. 231.

FONSECA, S. C. e MORAIS, A. (2000) – *Boas Práticas Pós-colheita para Hortícolas Frescos*. 1ª Ed. Porto: Orgal. pp. 10 – 14.

FONTES, P. C. R. e SILVA, D. J. H. (2002) – *Produção de Tomate de Mesa*. Viçosa: Aprenda Fácil. pp.197.

FRANCESCHI, S.; BIDOLI, E.; LA VECCHIA, C.; TALAMII, R.; D'AVANZO, B. e NEGRI, E. (1994) – Tomatoes and Risk of Digestive-Tract Cancers. *Int. Journal Cancer*. **59**:181 – 184.

GARDÊ, A. e GARDÊ, N. (1993) – *Culturas Hortícolas*. 6ª Ed. Lisboa: Clássica. pp. 469.

GIOVANNUCCI, E.; ASCHERIO, A.; RIMM, E. B.; STAMPFER, M. J.; COLDITZ, G. A. e WILLETT, W. C. (1995) – Intake of Carotenoids and Retinol in Relation to Risk of Prostate Cancer. *Journal Natl. Cancer Inst.* **87**:1767 – 1776.

GOODMAN, M. T.; KIVIAT, N.; MCDUFFIE, K.; HANKIN, J. H.; HERNANDEZ, B.; WILKENS, L. R.; FRANKE, A.; KUYPERS, J.; KOLONEL, L. N.; NAKAMURA, J.; ING, G.; BRANCH, B.; BERTMAN, C. C.; KAMEMOTO, L.; SHARMA, S. e KILLEEN, J. (1998) – The Association of Plasma Micronutrients with the Risk of Cervical Dysplasia in Hawaii. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **7**:537 – 544.

GRELADO, C. M. C. (1995) – *Avaliação de um Processo de Extração de um Sumo de Tomate*. Beja: Instituto Politécnico de Beja, Escola Superior Agrária de Beja.

HUSSEIN, L. e EL-TOHAMY, M. (1990) – Vitamin A Potency of Carrot and Spinach Carotenes in Human Metabolic Studies. *Int. Journal Vit. Nutr. Res.* **60**:229 – 235.

IBRAHEM, H. M.; ALWASH, A. H. (1983) – The Effect of Different Ratios of Tomato Pomace and Alfalfa in the Ration on the Digestion Performance of Lambs. *World Reviews of Animal Production*. **29**:31 – 35.

JACKSON, M. J. (1997) – The Assessment of Bioavailability of Micronutrients: Introduction. *Eur. Journal Clin. Nutr.* **51**:s1 – s2.

JOHANNSEN, M.; BRUNNER, G. (1997) – Solubilities of the Fat-Soluble Vitamins A, D, E and K in Super-critical Carbon Dioxide. *Journal of Chemical and Engineering Data*. **42**: 106 – 111.

KIRK, J. T. O. e TILNEY-BASSET, R. A. E. (1978) – *The Plastids. Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance*, 2<sup>nd</sup> ed. Amsterdam: Elsevier.

KOBORI, C. N.; JORGE, N. (2005) – Caracterização dos Óleos de algumas Sementes de Frutas como Aproveitamento de Resíduos Industriais. *Ciência Agrotec.* n.5, **29**:1008 – 1014.

KOHLMEIR, L.; KARK, J. D.; GOMEZ-GARCIA, E.; MARTIN, B. C.; STECK, S. E.; KARDINAL, A. F. M.; RINGSTAD, J.; THAMM, M.; MASAIEV, V.; RIEMERSMA, R.; MARTIN-MORENO, J. M.; HUTTUNEN, J. K. e KOK, F. J. (1997) – Lycopene and Myocardial Infarction Risk in the EURAMIC Study. *Am. Journal Epidemiol.* **146**:618 – 626.

LURIE, S.; HANDROS, A.; FALLIK, E. e SHAPIRA, M. (1996) – Reversible Inhibition of Tomato Fruit Gene Expression at High Temperature. *Plant Physiology.* **110**:1207 – 1214.

MARTINS, M. M. (1995) – *Produção de extractos de aroma de Thymus zygis L.: Extração por CO<sub>2</sub> Supercrítico versus Métodos Convencionais*. Dissertação para obtenção de grau de Doutor em Engenharia Agro-Industrial. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia. pp. 199.

MOURA, M. L.; SARGENT, S. A e OLIVEIRA, R. F. (1999) – Efeito da Atmosfera Controlada na Conservação de Tomates Colhidos em Estádio Intermediário de Maturidade. *Scientia Agrícola.* **56**:135 – 142.

PAZINATO, B. C. e GALHARDO, R. C. (1997) – *Processamento Artesanal do Tomate*. 2ª Impressão. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. pp.30.

PORTER, J. W.; ZSCHEILE, F. P. (1947) – Analytical Methods for Carotenes of Lycopersicon Species and Strains. *Department of Agriculture Chemistry Agricultural Experiment Station.* **19**:1.

PREGNOLATTO, W.; PREGNOLATTO, N. P. (1985) – *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. pp. 578.

RIBAYA-MERCADO, J. D.; GARMYN, M.; GILCHREST, B. A. e RUSSELL, R. M. (1995) – Skin Lycopene is Destroyed Preferentially over  $\beta$ -carotene During Ultraviolet Irradiation in Humans. *Journal Nutr.* **125**:1854 – 1859.

RIZO, P. e PORRINI, M. (1997) – Determination of Carotenoids in Vegetable Foods and Plasma. *Int. Journal Vit. Nutr. Res.* **67**:47 – 54.

ROCK, C. L. e SWENDSEID, M. F. (1992) – Plasma  $\beta$ -carotene Response in Humans after Meals, Supplemented with Dietary Pectin. *Am. Journal Clin. Nutr.* **55**:96 – 99.

ROBSON, G. e GRIERSON, D. (1993) – Tomato. In SEYMOUR, G. B., TAYLOR, J. E. e TUCKER, G. A. (Ed.) – *Biochemistry of Fruit Ripening*. 1<sup>st</sup> ed. London: Chapman & Hall. Cap. 14, pp.405 – 434.

SHI, J.; LE MAGUER, M. e BRYAN, M. (2002) – Lycopene from Tomatoes. In SHI, J.; LE MAGUER, M. e MAZZA, G. (Ed.) – *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects*, Volume 2, Functional Foods and Nutraceuticals Series, CRC Press. cap. 4, pp.135 – 163.

SHI, J.; MITTAL, G. ; KIM, E. e XUE, S. J. (2007) – Solubility of Carotenoids in Supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Reviews International.* **23**:4: 341 – 371.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. (1977) – Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture.* **28**:49 – 55.

SPANOS, G. A.; CHEN, H; SCHWARTZ, S. J. (1993) – Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of  $\beta$ -carotene from Sweet Potatoes. *Journal of Food Science.* **58**: 817 – 820.

SUN, M.; TEMELLI, F. (2006) – Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Carotenoids from Carrot Using Canola Oil as a Continuous Co-solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*. **37**: 397 – 408.

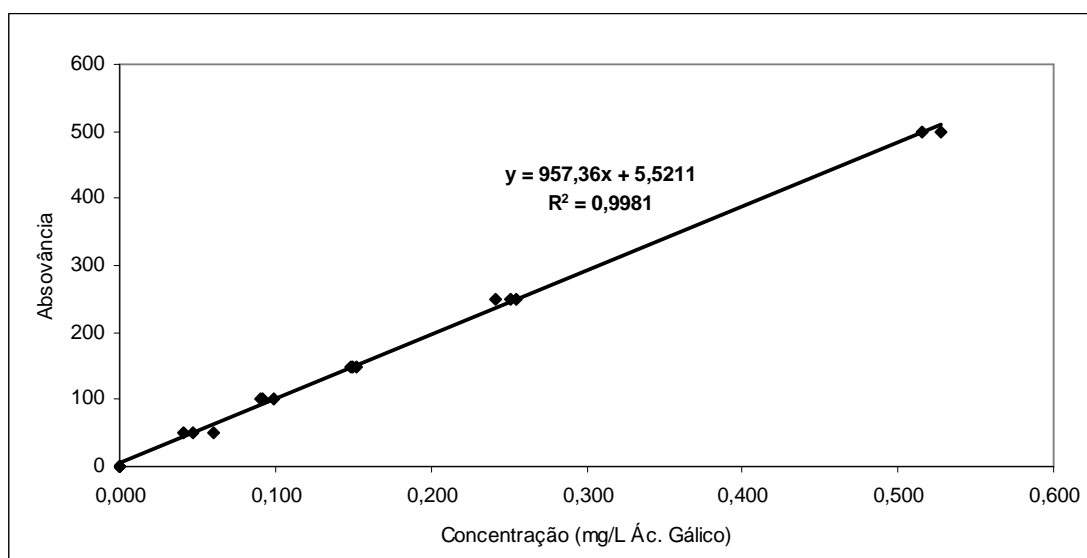
TRIGO, R. J. S. (1997) – *Estudo comparativo de processos de extracção de aroma de Poejo (Mentha pulegium L.)*. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agro-Industrial. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, pp. 65.

VANEGAS, J. A.G. (1987) – *Fisiologia pós-colheita de tomates (Lycopersicon esculentum Mill.) cultivar Ângela*. Dissertação (Mestrado). Campinas: Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade de Campinas, pp. 123.

WIEN, R. B. H. (1997) – *The Physiology of Vegetable Crops*. 2<sup>nd</sup> Ed. New York: Labi Publishing, pp. 662.

## 9. Anexos

### Anexo I – Curva Padrão do Ácido Gálico



**Fig. A.I.1: Curva padrão do ácido gálico**

## Anexo II – Ficha de Análise Sensorial de Tomate Fresco

### FICHA DE ANÁLISE DO PERFIL SENSORIAL DO TOMATE DE MESA (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Nome: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Código: \_\_\_\_\_

Analise as amostras e preencha as respostas na sequência em que aparecem na sua ficha de avaliação.

- 1 – Intensidade muito fraca
- 2 – Intensidade fraca
- 3 – Intensidade média
- 4 – Intensidade forte
- 5 – Intensidade muito forte

#### APARÊNCIA

COR

1 2 3 4 5  
☐ ☐ ☐ ☐ ☐

DEFEITOS

1 2 3 4 5  
☐ ☐ ☐ ☐ ☐

#### AROMA

CARACTERÍSTICO

1 2 3 4 5  
☐ ☐ ☐ ☐ ☐

ESTRANHO

1 2 3 4 5  
☐ ☐ ☐ ☐ ☐

#### SENSAÇÃO NA BOCA

SUCULÊNCIA DA POLPA

1 2 3 4 5  
☐ ☐ ☐ ☐ ☐

“FARINHENTA”

1 2 3 4 5  
☐ ☐ ☐ ☐ ☐

#### SABOR

CARACTERÍSTICO

1 2 3 4 5  
☐ ☐ ☐ ☐ ☐

DOCE

1 2 3 4 5  
☐ ☐ ☐ ☐ ☐

ÁCIDO

1 2 3 4 5  
☐ ☐ ☐ ☐ ☐

## Anexo III – Resultados da Análise Físico-Química de Tomate Fresco

**Tabela. A.III.1: Resultados da cor e da textura para as duas amostras de tomate**

Parâmetro	Tomate Português	Tomate Espanhol
L	43,88±0,1	44,68±0,1
C	30,86±0,1	30,60±0,1
h (°)	26,91±0,1	26,52±0,1
Textura (N)	5,81±0,5	6,61±0,5

**Tabela. A.III.2: Resultados das restantes análises físico-químicas para as duas amostras de tomate**

Parâmetro	Tomate Português	Tomate Espanhol
Humidade (%)	94,17±0,1	93,66±0,1
TSS (°Brix)	4,11±0,01	3,83±0,01
Acidez Titulável (mg/100g)	405,32±0,5	367,61±0,5
Ácido Ascórbico (mg/100g)	24,91±0,1	22,93±0,1
pH	4,06±0,01	4,07±0,01
Teor Fibra (%)	18,85±0,1	13,37±0,1
Fenóis Totais (mg/L)	48,83±0,5	111,50±0,5
Teor Licopeno (mg/100g) BH	7,13±0,1	5,34±0,1
Teor Licopeno (mg/100g) BS	41,56±0,1	33,85±0,1

## Anexo IV – Resultados da Análise Sensorial de Tomate Fresco

**Tabela. A.IV.1: Resultados da análise sensorial do tomate português**

<b>Parâmetro</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>
Cor	3,29	0,78	5	2
Defeitos	1,07	0,27	2	1
Aroma Característico	3,36	0,74	4	2
Aroma Estranho	1,43	0,65	3	1
Suculência Polpa	3,57	0,65	4	2
Textura “Farinhenta”	1,79	0,89	4	1
Sabor Característico	3,14	0,86	4	2
Sabor Doce	2,36	0,63	4	2
Sabor Ácido	2,64	1,08	4	1

**Tabela. A.IV.2: Resultados da análise sensorial do tomate espanhol**

<b>Parâmetro</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>
Cor	3,00	0,61	4	2
Defeitos	1,21	0,43	2	1
Aroma Característico	3,71	0,73	5	3
Aroma Estranho	1,29	0,61	3	1
Suculência Polpa	3,21	0,58	4	2
Textura “Farinhenta”	2,29	1,14	4	1
Sabor Característico	3,21	0,70	4	2
Sabor Doce	2,71	0,99	4	1
Sabor Ácido	2,43	0,94	4	1

## Anexo V – Resultados da Extração Supercrítica

Temperatura (°C)	[Etanol] (%)	[Azeite] (%)	Extracto Total (g/100g)	Lícopeno Total (mg/100g)	$\alpha$ -caroteno Total (mg/100g)	$\beta$ -caroteno Total (mg/100g)	Outros Carotenóides (mg/100g)	Carotenóides Totais (mg/100g)
75	10	0	1,946	1,265	0,129	0,049	0,021	1,465
57,5	5	5	4,167	1,984	0,294	0,071	0,067	2,416
40	10	10	8,876	1,882	0,257	0,046	0,080	2,265
75	10	10	1,467	0,502	0,044	0,023	0,012	0,580
40	0	0	2,465	2,106	0,519	0,118	0,116	2,860
40	10	0	2,349	2,181	0,747	0,137	0,080	3,145
75	0	10	1,423	1,308	0,104	0,037	0,030	1,479
75	0	0	1,570	1,602	0,198	0,068	0,028	1,896
40	0	10	5,464	1,890	0,550	0,132	0,084	2,656